

27.11.98

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年11月27日

REC'D 22 JAN 1999

WIPO

PCT

出願番号  
Application Number:

平成 9年特許願第342060号

出願人  
Applicant(s):

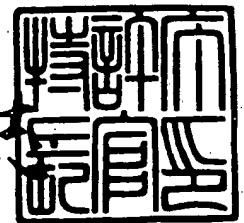
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1999年 1月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平10-3103812

【書類名】 特許願

【整理番号】 P97XX-074

【提出日】 平成 9年11月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 ヒト胎児軟骨細胞由来遺伝子

【請求項の数】 11

【発明者】

    【住所又は居所】 広島県広島市東区牛田早稲田3丁目6-9-501

    【氏名】 加藤 幸夫

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県吉敷郡阿知須町2580番地の17

    【氏名】 河本 健

【発明者】

    【住所又は居所】 広島県広島市南区西旭町14-24-405

    【氏名】 小谷野 康彦

【特許出願人】

    【識別番号】 000003311

    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100088155

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

    【識別番号】 100089978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

    【識別番号】 100092657

【弁理士】

【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100094318

【弁理士】

【氏名又は名称】 山田 行一

【選任した代理人】

【識別番号】 100089901

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉井 一男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト胎児軟骨細胞由来遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エズリン様ドメイン、Db1ドメイン、およびプレックストリンドメインを1分子内に含むタンパク質。

【請求項2】 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、

(1) 配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、

(2) 配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、かつ

(3) 配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するタンパク質。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項5】 配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNA。

【請求項6】 請求項5に記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項7】 配列番号1に示す塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNA。

【請求項8】 配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNA。

【請求項9】 請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質に対する抗

体。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質を用いる、細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質を用いる、抗癌剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子、該遺伝子がコードするタンパク質、及び、該タンパク質に対する抗体に関するものである。

【0002】

【従来技術】

軟骨の分化や変性のメカニズムを解析する上で不可欠であり、また、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療法を開発する上で重要である。分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子の探索及び該遺伝子のコードするタンパク質の性質の解析は、ヒトの軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法が確立されていなかったことから従来は十分ではなかった。

【0003】

しかし、最近本発明者等により、ヒトの軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法が確立され (M.Shen, T.Kawamoto, W.Yan, K.Nakamasu, M.Tamagami, Y.Koyano, M.Noshiro, and Y.Kato Biochemical and Biophysical Research Communications 236, 294-298 (1997))、係る培養方法を用いてヒト由来の分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子の探索、及び該遺伝子のコードするタンパク質の性質の解明が強く望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記ヒト由来の軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法を用いて、分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現している新規な遺伝子を取得することを主たる目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、既に報告されている軟骨細胞の分化状態での培養方法を用いて、分化した軟骨細胞と脱分化した軟骨細胞との間で発現に差異のある遺伝子の探索を行い、前者に特異的に発現している遺伝子を見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質を提供するものである。

【0007】

また、配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、

(1) 配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、

(2) 配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、かつ

(3) 配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するタンパク質を提供するものである。

【0008】

さらに、本発明は、上記記載のタンパク質をコードするDNAを提供するものである。

【0009】

また、本発明は、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNAを提供するものである。

【0010】

さらに、本発明は、上記記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを提供するものである。

【0011】

さらに、本発明は、配列番号1に示す塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNAを提供するものである。

さらに、本発明は、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNAを提供するものである。

【0012】

また、本発明は、上記本発明に係るタンパク質に対する抗体を提供するものである。

【0013】

より詳しくは、本発明に係るタンパク質のアミノ酸配列は、N末端側から、エズリン(Ezrin)様ドメイン、Dblホモロジー(DH)ドメイン、プレックストリンホモロジー(Pleckstrin homology)(PH)ドメインという3つのドメインを1つの分子内に含んでいるものである。従って、この新規タンパク質は、細胞膜近傍に存在し、細胞形態の維持や運動を司るアクチン系細胞骨格の機能を調節しているRhoファミリーの活性を制御する極めて重要な因子である可能性を有するものである。

【0014】

また、本発明に係るタンパク質の機能を活性化あるいは抑制することにより、細胞分化誘導や癌の増殖を調節する薬剤等の開発が可能となる。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を説明する。

【0016】

配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列は、配列表の配列番号1において示す本発明により見出されたDNAから導かれるものであり、後記実施例に示すように分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子を探索した結果、初めて明らかになったものである。この導かれたアミノ酸配列を有するタンパク質を本明細書においては、CDEPとも呼ぶ。

【0017】

すなわち、CDEPをコードする遺伝子（以下、CDEP cDNAとも呼ぶ）の全ヌクレオチド配列は配列表の配列番号1に記載されている。また、得られたヌクレオチド配列から演繹されたアミノ酸との対応については、配列表の配列番号1及び図1（アミノ酸は3文字表記で示す）において示されている。

#### 【0018】

CDEP cDNAは、ヌクレオチド残基49番目に存在する最初のATGコドンから開始する3135bpのオープンリーディングフレームを含むものである。また、5'領域（ヌクレオチド残基34番目）の上流にフレーム内ストップコドンがあることから、最初のATGが開始コドンと帰属される。

#### 【0019】

従って、CDEPは1045アミノ酸残基からなり、計算される分子量は118.6kDaと推定されるものである。

#### 【0020】

上記塩基配列から導かれるCDEPのアミノ酸配列は配列表の配列番号2および図1に記載されている。得られたアミノ酸配列から、分泌のためのシグナルペプチドと、膜通過性または膜結合性ドメインの疎水性領域を欠いていることがわかる。

#### 【0021】

また、少なくとも3つのポリアデニル化シグナルとポリアデニル化サイトがあることがわかる（図1）。ポリAトラクトを除く、3287bp、3306bp、または3442bpの全長は、以下説明するノーザンブロット分析により決定されたmRNAのサイズ（3.5kb、図2（a）で矢印3.5kbと記載）に合致するものである。

#### 【0022】

また、導かれたアミノ酸配列について、タンパク質データベースによるホモロジー検索の結果、本発明に係るCDEPは、エズリン様（Ezrin-like）ドメイン、DHドメイン、およびPHドメインの3つの機能的ドメインが含まれていることがわかる（図1、3、4）。係るエズリン様ドメインおよびDH、PHドメインを共に有するタンパク質は従来知られておらず、本発明に係るCDEPが最



初の例である。

# 【0023】

ここで、CDEPが有するエズリン様ドメインは、従来知られている、エズリン、ラディキシン、モエシンおよびバンド4.1を含むバンド4.1スーパーファミリーにおいて保存されているものを意味する。さらに、図3にその相同性について示されているが、CDEPのエズリン様ドメインは、エズリンと27.5%の相同性を、またバンド4.1と43.7%の相同性を有することがわかる。

# 【0024】

エズリン等のタンパク質は、細胞骨格と細胞膜間のリンカータンパク質としての役割があると考えられている。また、最近、N末端領域にエズリン様ドメインを含むいくつかのタンパク質も報告されているが、その中で、マーリンは、神経繊維腫タイプ2の原因となる腫瘍抑制分子であり、PTPMEG1とPTPH1は、細胞質タンパク質チロシンリン酸化酵素(PTP、protein tyrosine phosphatase)ファミリーのメンバーであることが知られている。

# 【0025】

これらのタンパク質は細胞膜と細胞骨格間の境界での細胞外から細胞内へのシグナル伝達に参与していることが知られている。さらに、注目すべきことは、エズリン、ラディキシンおよびモエシン(これらをERMタンパク質という)は、ヒアルロン酸レセプターであるCD44の細胞質ドメインにそれらのN末端領域を通じて結合することである。また、CD44へのERMタンパク質の結合は、GTP $\gamma$ Sにより強化され、Rhoの特異的インヒビターであるC3トキシンで著しく抑制されることである。このように、GTP-Rhoは、CD44/ERMタンパク質複合体の形成に必要とされるものである。

# 【0026】

CDEPはさらに、DH、PHドメインをも有するものである。オンコジーン生成物であるDbl、Ost、Ect2、Lbc、および faciogenital dysplasia原因遺伝子であるFGD1を含むRhoGEFファミリーも、DHドメインを含み、そのC末端では直接PHドメイン(DH-PH配列)に結合していることが知られているが、CDEPとの間のDHドメインの相同性は、Dblと22.

、9%、Ostと22.9%、Ect2と22.3%、およびFGD1と25.6%である(図4)。

#### 【0027】

RhoGEFは、特に、GDP-Rho(不活性型)をGTP-Rho(活性型)へと変化させ、一方RasGEFsはGDP-RasをGTP-Rasへ変化させることが知られている。

#### 【0028】

RhoおよびRasは低分子量GTP結合タンパク質スーパーファミリーに属し、細胞内シグナル伝達に関与することが知られている。またスーパーファミリーは5つのサブファミリー、即ち、Ras、Rho、Rab、Arf、およびその他に分けられる。このRhoサブファミリー(Rho、RacおよびCdc42)は、細胞の形態、移動、凝集、接着を、アクチンフィラメントの収縮により制御するものであることが知られている。Rhoカスケードの上流には、GEFsおよびGTPase活性タンパク質(GAPs)のようなRhoのいくつかの制御因子(regulator)が存在することも知られている。

#### 【0029】

また、DH-PHDドメインは、RhoGEF活性に必要であり、一方Cdc-25ドメインは、RasGEF活性に必要であること、Ras-GRFおよびSosのようなRasGEFファミリーメンバーのいくつかは、RasGEF活性を有するが、たとえそれらがCdc-25ドメインに加えてDH-PHDドメインを有していてもRhoGEF活性はないことが知られている。

#### 【0030】

本発明に係るCDEPは、上で示したように、Cdc-25ドメインがなく、DH-PHDドメインを含むので、CDEPはRhoGEFファミリーのメンバーであり、RasGEFファミリーではないと思われる。

#### 【0031】

エズリン様ドメインを有するERMタンパク質は、CD44/ERM/アクチン複合体の形成を通じて細胞の形態変化を導くシグナル伝達に関与することが知られているが、この複合体の形成には、RhoのRhoGEFによる活性を必要

とする。本発明において得られたCDEPは、一分子内で、エズリン様ドメインと、RhoGEF様ドメインを共に含むという極めてユニークなタンパク質であることがわかる(図5)。これは、CD44経路および/または他のレセプターを介する経路においてシグナル伝達を変更する可能性を示唆している。さらには、RhoGEFファミリーの多くのメンバーが、N末端領域の欠如によって、がん遺伝子となっていることから、CDEPが、軟骨細胞を含むあるタイプの細胞の接着、拡散、移動、増殖、および分化を制御するに重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

#### 【0032】

従って、本発明に係るCDEPタンパク質は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質だけでなく、配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成るもので、分子内にエズリン様ドメイン、及びDH、PHドメインを共に有する新規なアミノ酸配列を有するものも含む。特に、配列番号2におけるアミノ酸番号で1～373のアミノ酸配列(エズリン様ドメイン)が、該配列番号2のアミノ酸配列と70%以上(好ましくは85%以上)の相同性を有し、さらに配列番号2におけるアミノ酸番号で544～737のアミノ酸配列(DHドメイン)が、該配列番号2のアミノ酸配列と70%以上(好ましくは85%以上)の相同性を有し、かつ、配列番号2におけるアミノ酸番号で764～854のアミノ酸配列(PHドメイン)が、該配列番号2のアミノ酸配列と70%以上(好ましくは85%以上)の相同性を有するものを含む。

#### 【0033】

係るアミノ酸配列を有するタンパク質は、CDEPの特徴である、エズリン様、DH、PHドメインと実質的に同じドメインを有し、従って、CDEPと実質的に同様の生化学的機能を有するものと推定される。

#### 【0034】

さらに、本発明に係るDNAは、上記CDEPをコードするもののみならず、配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成るもので、分子内にエズリン様ドメイン、

、及びDH、PHドメインを共に有する新規なアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAも含む。特に、配列番号2におけるアミノ酸番号で1～373のアミノ酸配列（エズリン様ドメイン）が、該配列番号2のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有し、さらに配列番号2におけるアミノ酸番号で544～737のアミノ酸配列（DHドメイン）が、該配列番号2のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有し、かつ、配列番号2におけるアミノ酸番号で764～854のアミノ酸配列（PHドメイン）が、該配列番号2のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有するタンパク質をコードするDNAを含む。

【0035】

なお、ここで、「タンパク質をコードする」とは、DNAが2本鎖である場合には、相補2本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有することを意味する。

【0036】

アミノ酸残基の置換、欠失又は挿入は、部位特異的突然変異などの公知の方法によって塩基配列にヌクレオチドの置換、欠失、挿入などの変異を導入することによって生じさせることができ、当業者は容易に選択することができる。

【0037】

また、本発明に係るタンパク質を得るためには、通常の遺伝子工学的手法などで製造可能である。

【0038】

本発明DNAは、さらに、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなるDNAを含むものである。

【0039】

さらに、上記DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAをも含むものである。

【0040】

ここでストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値

化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば完全にマッチしたハイブリッドの $T_m$ から該 $T_m$ より20℃低い温度までの範囲の温度、あるいは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。

## 【0041】

本発明に係る上記DNAは、本発明により後記実施例に示すようにその塩基配列の一つが決定されたので、この配列に基づいて合成することが可能である。また、この塩基配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションによって染色体DNAから得ることもできる。あるいは、軟骨のmRNAを用いてRT-PCRを行うこと、軟骨などのcDNAライブラリーを、DEC1の全部又は一部をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングすることによっても得ることができる。

## 【0042】

さらに、上記本発明に係るタンパク質は、公知の発現ベクターに本発明DNAを挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを導入して形質転換された細胞を得、形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明タンパク質を培養物中に生成蓄積させ、その培養物から該タンパク質を採取することによって製造することができる。

## 【0043】

細胞及び発現ベクターとしては、外来タンパク質の発現に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例えば、大腸菌等の原核細胞とそれに適した発現ベクター、哺乳類細胞等の真核細胞とそれに適した発現ベクターの組み合わせが挙げられる。培地や培養条件は、用いる細胞に合わせて適宜選択される。

## 【0044】

本発明タンパク質は、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させてもよい。また、本発明タンパク質は全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

## 【0045】

培養物とは、培地および当該培地中の細胞であり、培養物からの本発明タンパク質の採取は、上記の本発明タンパク質の活性等を指標にして、公知のタンパク質の精製方法によって行うことができる。

## 【0046】

本発明に係るタンパク質に結合し得る抗体（以下、本発明抗体ともいう）は、本発明タンパク質を抗原として用いて、常法に従って作製することができる。本発明抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。

## 【0047】

本発明タンパク質は、そのまま抗原として用いてもよいが、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリアタンパク質と結合させて、及び／又は、アジュバントを併用して抗原として用いることが好ましい。

## 【0048】

ポリクローナル抗体は、例えばマウス、ウサギ、モルモット、ヒツジ等の被免疫動物を、上記抗原を皮下、腹腔内、静脈内注射等により投与することにより免疫し、免疫した動物から血清を採取することによって得ることができる。

## 【0049】

モノクローナル抗体は、例えば、以下のようにして得ることができる。マウス、ウサギ、モルモット、ヒツジ等の被免疫動物を、上記抗原を皮下、腹腔内、静脈内注射等により投与して免疫した後に脾臓やリンパ節を摘出し、これから採取した細胞と、好ましくは被免疫動物と同種の動物に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させてハイブリドーマを樹立し、得られたハイブリドーマから上記抗原に対する特異的抗体を継続的に産生する細胞株を、スクリーニングとクローニングを繰り返すことによって選択する。こうして選択された細胞株を好適な培地で培養することによって、培地中にモノクローナル抗体を産生させる。あるいは、マウスの腹腔内等の生体内で培養することにより腹水中等に産生させる。

## 【0050】

得られたポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の精製法としては、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAEセルロースカラム等を用いるイオン交換クロ、

マトグラフィー、プロテインAカラム等を用いるアフィニティクロマトグラフィー、免疫吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。なお、本発明抗体は、例えば、本発明タンパク質及び標識抗体を用いる免疫測定法等により検出することができる。

## 【0051】

本発明抗体は、抗原結合部位(Fab)が保存されている限り、フラグメント化されたものでもよい。フラグメント化された本抗体として具体的には、例えば抗原結合部位を分解しないパパイン等のプロテアーゼで本抗体を分解して得られるFabを含むフラグメントが挙げられる。

## 【0052】

本発明抗体は、標識物質と結合させることによって標識化されていてもよい。標識物質としては、タンパク質の標識に通常使用可能なものであれば、特に限定されず、酵素、アイソトープ、蛍光物質等が挙げられる。

## 【0053】

本発明に係る、本発明に係るタンパク質を用いる細胞分化誘導調節剤のスクリーニング法としては、具体的には、例えばテトラカルチノーマなどの分化能のある細胞に添加することにより実際の変化、例えば分化したかどうかを形態及び／又はマーカー遺伝子の発現を調べることにより可能である。若しくは、化学合成した種々の薬剤を細胞に添加して、CDEPの発現量を変化させ得るものを検索することにより可能である。

## 【0054】

また、本発明に係る、本発明に係るタンパク質を用いる抗癌剤のスクリーニング方法としては具体的には例えば、N末端側が欠損したCDEP cDNAを導入することにより癌化させた細胞に、化学合成した様々な薬剤を添加して、細胞を正常に復帰させる薬剤を検索することにより可能である。

## 【0055】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明を説明する。

## 【0056】

以下説明す実施例において使用しPCR用プライマーは通常の自動合成方法を用いて合成した。

【0057】

タイプIIコラーゲン用：CATACCGGTAAGTGGGGCAAGACTG、TGCCCAGTTCAGGTCTCTTA

アグレカン用：TGCTACTTCATCGACCCCAT、AAAGACCTCACCCCTCCATCT

CMP用：GTCGATTACGTGGAGAGCTA、ATGAACTTCTTCACCAGCTC

GAPDH用：GTCAAGGCTGAGAACGGGAA、TCCACCACCCTGTTGCTGTA

DEC1用：ATCAGACCCAGCTCCCAAAG、CACAGACCCAGCTCCCAAAC

CDEP用：CCTTCAGGAAAACCTCGTGTC、TTGGAGTTGTGTGTGGTCAG

CDEP cDNAフラグメント用：GCCAAAATAGTCACCTTCCACGAGG、

CCTTCAGGAAAACCTCGTGTC、AAACGRAAGAAYGTRTGRTGYTCWACACA、

TTCCAGCTCCTAGAGATTGC、TCGTCTCGCTCTCCTCAAT、CGGGTAACAAGCAGGCGGACGGA

【実施例1】

分化状態における軟骨細胞の培養は、Biochemical and Biophysical Research Communications 236, 294-298 (1997) M.Shen, T.Kawamoto, W.Yan, K.Nakamasu, M.Tamagami, Y.Koyano, M.Noshiro, and Y.Katoに記載の方法に準じて以下のよう

に実施した。

【0058】

およそ妊娠25週で自然流産したヒト胎児 (Norman Bethune University of Medical Sciencesから入手) の膝関節の大腿骨側の骨端軟骨を採取した。この軟骨から、細切した軟骨を3mg/mlのコラゲナーゼ (タイプIA、Sigma) を含む $\alpha$ 改変イーグル培地 ( $\alpha$ -MEM) 中で3時間インキュベートすること以外はSimomura et al. (1975) Calcif. Tissue Res. 19, 179-187に記載の方法と同じ方法によって軟骨細胞を単離した。得られた細胞を $1 \times 10^5$ 個/ディッシュの密度でI型コラーゲン被覆ディッシュにまき、10% 牛胎仔血清、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸、32単位/mlのペニシリン及び40  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含む $\alpha$ -MEM (10ml/ディッシュ) 中で培養した。サブコンフルエント (subconfluent) になったところでジブチリルcAMP (dbcAMP) (1mM) を培養培地に添加した。dbcAMPの存在下及び非存在下の



いずれかで2週間以上培養した後、細胞の形態学的観察を行うとともに、細胞を集め、エタノールで固定した後トルイジンブルーで染色した。

【0059】

d b c AMPの存在下で培養した軟骨細胞は球形を呈して、細胞外基質に富んでいたのに対し、非存在下で培養した軟骨細胞は、紡錘形の線維芽細胞様であり細胞外基質に乏しかった。

【0060】

また、硫酸化プロテオグリカンを選択的に染色するトルイジンブルーによる染色では、d b c AMP存在下で培養した軟骨細胞は、良好に染色されたが、非存在下で培養した軟骨細胞は、ほとんど染色されなかった。

【0061】

また、分子マーカーとして、II型コラーゲン、アグリカン並びにCMPのmRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。分子マーカーの発現をd b c AMP存在下と非存在下で比較した結果、d b c AMP存在下では分化状態が維持されていることが示唆された(図6)。

【0062】

従って、d b c AMP存在下で培養した軟骨細胞は、軟骨としての分化状態を維持している、すなわち分化表現型が維持されていると認められた。

【0063】

d b c AMPの上記効果の用量依存性を調べたところ、該効果は用量依存的に増大し、0.3~0.5 mMで最大になった。

【0064】

なお、d b c AMPに代えて、ウサギ及びニワトリの軟骨細胞の分化表現型の発現を安定させたり刺激したりすると報告されているb FGF (0.4 ng/ml) 及びTGF- $\beta$  (3 ng/ml) を用いて上記と同様に軟骨細胞を培養したが、これらによってはヒト由来の軟骨細胞の分化表現型の発現が維持されなかった。

【0065】

【実施例2】分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子

実施例1に記載されたようにdbcAMPの存在下及び非存在下に培養された軟骨細胞から、グアニジンチオシアネート/セシウムトリフルオロアセテート法により全RNAを抽出した。ポリ(A)<sup>+</sup>RNAをOligotex-dT30 (Roche) を用いて濃縮した。分化軟骨細胞(+dbcAMP)では発現するが、脱分化軟骨細胞(-dbcAMP)では発現しないmRNAをコードするクローンをサブトラクティブハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)法により選択した。PCRセレクトcDNAサブトラクションキット(Clontech)を用いて、分化軟骨細胞のmRNA由来のcDNAを、脱分化軟骨細胞のmRNA由来のcDNAの過剰量に対しハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしない、すなわち分化状態で発現するcDNAが、製造者の指示書に従って、サブプレッションPCRにより増幅された。得られたPCR産物をTテールベクターのpGEM-T (Promega) にクローニングし、約120個のクローンの塩基配列決定を行った。更なる分析のために1個のクローンを選択し、対応するタンパク質産物をCDEPと命名した。

#### 【0066】

CDEPの1.6kbフラグメントをプローブとして用いて、CDEPのmRNAの種々のヒト胎児組織における発現をノーザンブロットにより調べた結果を図2(a)、(b)に示す。ここで、5.0kbの転写物もまたノーザンブロット分析で検出されているが、これは、3.5kb mRNAから導かれるPCR産物に加えて、すなわち多分CDEPプローブとハイブリ可能な5.0kb mRNAから誘導されたより大きなバンドがRACE-PCRでも見出されたものであると考えられる(結果は示さず)。しかし5.0kbの転写物に対応する生成物の塩基配列決定はいまだされていない。

#### 【0067】

ノーザンブロット分析による培養軟骨細胞および種々のヒト組織においてのCDEP mRNAの発現パターンは、図2(a)に示すように、サイクリックAMP依存分化軟骨細胞に、2つの主バンド3.5kbと、5.0kbが検出されたが、サイクリックAMPなしの繊維芽細胞には検出されなかった。また、胎児組織においては、脳と脾臓が最も高いレベルのCDEP mRNAを示し、心臓、肝

臓、腸が低いか中間的なレベルの cDEP mRNAであった (図2 (a))。さらに、成人組織においては、腎臓、精巣、肺で中程度、心臓、肝臓、小腸ではかなり低い程度の発現量であった (図2 (b))。

#### 【0068】

なお、ノザンプロットは以下のようにして行った。全RNA ( $10 \mu\text{g}$ ) をホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動し、ハイボンド-Nメンブラン (Amersham) に転写した。組織分布を調べるため、種々のヒト胎児組織の全RNAがNorman Bethune University of Medical SciencesのLi Yu博士より提供された。CDEPの1.6kbフラグメントを [ $^{32}\text{P}$ ] dCTPで標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして用いた。メンブランを65℃で30分間、0.5% SDSを含む0.2×SSCにより洗浄した。洗浄したメンブランにより、-70℃で増感膜を用いてバイオマックスX線フィルムを感光させた。

#### 【0069】

CDEPのcDNAの全長の塩基配列決定は以下のように行った。CDEP全長cDNAを、マラソン (Marathon) cDNA増幅キット (Clontech) を用いるラピッドアンプリフィケーションcDNAエンド (RACE, rapid amplification cDNA ends) 法により単離した。すなわち、二本鎖cDNAをマラソンcDNAアダプターに連結し、サプレッションPCRに付した。反応は、アダプタープライマーと、CDEPの塩基配列に基づいてCDEP用に設計した遺伝子特異的プライマーとを用いて行った。増幅したcDNA試料を4%ポリアクリルアミドゲルで分離し、主要バンドのDNAをゲルから抽出し、pGEM-Tにサブクローニングした。サブクローニングされたプラスミドの二本鎖DNA及び一連の合成オリゴヌクレオチドを配列決定テンプレート及び特異的プライマーとしてそれぞれ用いた。DNA配列決定は、シークエナーゼ7-デアザー-dGTP DNAシークエンシングキット (Amersham) 又はABIプリズム310オートシークエンサー (Perkin Elmer) を用いて、サンガー法によって行った。

#### 【0070】

このようにして決定されたCDEP cDNAの塩基配列とそれから推測されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。また、このアミノ酸配列のみを配列番号2

に示す。CDEP cDNAは、3135bpのオープンリーディングフレームを有している。ポリA領域を除いた3287bp、3306bp、または3442bpの長さは、上記ノザンブロット分析で得られたmRNAのサイズ(3.5kb)によく一致する。5'領域(ヌクレオチド34)にインフレームとなるストップコドンがあるので、最初のATGが開始コドンと認められる。

#### 【0071】

##### 【発明の効果】

以上説明したように、本発明により、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子が提供される。これらは、軟骨の分化や変性のメカニズムを解析する上で重要であるばかりでなく、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療の開発にとっても重要である。さらには、本発明に係るCDEPは軟骨以外の組織においても発現していることから係る軟骨以外の組織においても重要な作用を示唆するものである。

#### 【0072】

すなわち、本発明に係るCDEPは、その構造上の特徴から、細胞膜上のタンパク質と結合する細胞骨格の調節因子であると同時に、Rhoの機能を調節する上位因子である特徴的構造を有する。アクチン系細胞骨格の制御、すなわち、上流からのシグナルを受けてRhoを活性化させ、その下流のシグナル伝達を制御する場合は、それによって細胞形態の維持、細胞接着、細胞凝集、細胞運動などの調節していると考えられる。また、細胞骨格の調節因子という側面から考えてみると、細胞増殖因子による刺激や、細胞の形質転換によって起こる細胞骨格の再構築の際に重要な働きを果たしていることが考えられる。軟骨細胞にとって細胞形態の変化は、分化と密接な関わりを持っており、分化した軟骨細胞は球形を呈しているのに対し、脱分化した軟骨細胞は紡錘形を呈していることが知られている。従って、CDEPの機能を亢進あるいは抑制することによって細胞形態を球形に変化させることが可能であれば、軟骨細胞の分化を誘導または維持させることができると考えられる。そのような作用を期待した遺伝子導入などにより、変形性関節症をはじめとする関節疾患において、機能が逸脱(脱分化)した軟骨細胞の分化状態の制御を行うことも可能になると考えられる。

## 【0073】

一方、他のRho GEFファミリーでは、N末端側のアミノ酸の欠如を引き起こすような異常により、ガン遺伝子として働くことが知られている。これらは、ガンの浸潤能を高めるとの報告もある。もし、CDEP遺伝子の一部が欠損するなどの活性型変異により細胞のガン化が起こることが見出されれば、CDEPをターゲットとして特異的な抑制効果のある新規の治療薬の開発に繋がると考えられる。

また、CDEPのドミナントネガティブな変異体を作成し、その遺伝子をガン細胞に導入してその活性を抑制することによって、ガン治療に結びつけることも考えられる。Rhoファミリー全体の機能をいかに制御するかが、今後のガン研究の大きなテーマになるとの考えもあり、そのターゲットの1つになりうると思われる。

## 【0074】

Ezrinは、N末端で細胞膜上のCD44などと結合し、C末端側でアクチンと結合して細胞骨格の調節に参与している。一方、Rhoはこの結合を調節していると考えられる。Ezrin-likeドメインをN末端に、DH,PHドメインをC末端に持つCDEPは、N末端で細胞膜上のタンパク質と結合し、C末端側ではRhoの活性化を行っていると考えられる。従って、CDEPは細胞膜に結合する細胞骨格の調節因子であると同時に、細胞骨格の状態をフィードバックしてRhoへのシグナルを調節している因子であることが考えられる。

【0075】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3442

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起原

生物名：ヒト

細胞の種類：軟骨細胞

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：49..3183

配列

CGCCGCAGCC GCCGGCGCTG TGGAGATATT CTCTAAGCCG CTTTCATC ATG GGA GAA ATA 60

Met Gly Glu Ile

1

GAG CAG AGG CCG ACC CCA GGA TCA CGA CTG GGG GCC CCG GAA AAT 105

Glu Gln Arg Pro Thr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Ala Pro Glu Asn

5

10

15

TCG GGG ATC AGT ACC TTG GAA CGT GGA CAG AAG CCG CCC CCA ACA 150

Ser Gly Ile Ser Thr Leu Glu Arg Gly Gln Lys Pro Pro Pro Thr

20

25

30

CCT TCA GGA AAA CTC GTG TCC ATC AAA ATC CAG ATG CTG GAT GAC 195

Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Ile Lys Ile Gln Met Leu Asp Asp

35

40

45

ACC CAG GAG GCA TTT GAA GTT CCA CAA AGA GCT CCT GGG AAG GTG 240

Thr Gln Glu Ala Phe Glu Val Pro Gln Arg Ala Pro Gly Lys Val

50	55	60	
CTG CTG GAT GCA GTT TGC AAC CAC CTC AAC CTC GTG GAA GGT GAC	285		
Leu Leu Asp Ala Val Cys Asn His Leu Asn Leu Val Glu Gly Asp			
65	70	75	
TAT TTT GGC CTC GAG TTT CCT GAT CAC AAA AAG ATC ACG GTG TGG	330		
Tyr Phe Gly Leu Glu Phe Pro Asp His Lys Lys Ile Thr Val Trp			
80	85	90	
CTG GAT CTC CTA AAA CCC ATT GTG AAA CAG ATT AGA AGG CCA AAG	375		
Leu Asp Leu Leu Lys Pro Ile Val Lys Gln Ile Arg Arg Pro Lys			
95	100	105	
CAC GTT GTT GTT AAG TTT GTG GTG AAA TTC TTT CCG CCT GAC CAC	420		
His Val Val Val Lys Phe Val Val Lys Phe Phe Pro Pro Asp His			
110	115	120	
ACA CAA CTC CAA GAA GAA CTC ACA AGG TAC CTG TTC GCG CTG CAG	465		
Thr Gln Leu Gln Glu Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Gln			
125	130	135	
GTG AAG CAG GAC TTG GCT CAA GGC AGG TTG ACG TGT AAT GAC ACC	510		
Val Lys Gln Asp Leu Ala Gln Gly Arg Leu Thr Cys Asn Asp Thr			
140	145	150	
AGC GCA GCT CTC TTG ATT TCA CAC ATT GTG CAA TCT GAG ATT GGG	555		
Ser Ala Ala Leu Leu Ile Ser His Ile Val Gln Ser Glu Ile Gly			
155	160	165	
GAT TTT GAT GAA GCC TTG GAC AGA GAG CAC TTA GCA AAA AAT AAA	600		
Asp Phe Asp Glu Ala Leu Asp Arg Glu His Leu Ala Lys Asn Lys			
170	175	180	
TAC ATA CCT CAG CAA GAC GCA CTA GAG GAC AAA ATC GTG GAA TTT	645		
Tyr Ile Pro Gln Gln Asp Ala Leu Glu Asp Lys Ile Val Glu Phe			
185	190	195	
CAC CAT AAC CAC ATT GGA CAA ACA CCA GCA GAA TCA GAT TTC CAG	690		

His His Asn His Ile Gly Gln Thr Pro Ala Glu Ser Asp Phe Gln		
200	205	210
CTC CTA GAG ATT GCC CGT CGG CTA GAG ATG TAT GGA ATC CGG TTG		735
Leu Leu Glu Ile Ala Arg Arg Leu Glu Met Tyr Gly Ile Arg Leu		
215	220	225
CAC CCG GCC AAG GAC AGG GAA GGC ACG AAG ATC AAT CTG GCC GTT		780
His Pro Ala Lys Asp Arg Glu Gly Thr Lys Ile Asn Leu Ala Val		
230	235	240
GCC AAC ACG GGA ATT CTA GTG TTT CAG GGT TTC ACT AAG ATC AAT		825
Ala Asn Thr Gly Ile Leu Val Phe Gln Gly Phe Thr Lys Ile Asn		
245	250	255
GCC TTC AAC TGG GCC AAG GTG CGG AAG CTG AGC TTC AAG AGG AAG		870
Ala Phe Asn Trp Ala Lys Val Arg Lys Leu Ser Phe Lys Arg Lys		
260	265	270
CGC TTT CTC ATC AAG CTC CGG CCA GAT GCC AAT AGT GCG TAC CAG		915
Arg Phe Leu Ile Lys Leu Arg Pro Asp Ala Asn Ser Ala Tyr Gln		
275	280	285
GAT ACC TTG GAA TTC CTG ATG GCC AGT CGG GAT TTC TGC AAG TCC		960
Asp Thr Leu Glu Phe Leu Met Ala Ser Arg Asp Phe Cys Lys Ser		
290	295	300
TTC TGG AAA ATC TGT GTT GAA CAT CAT GCC TTC TTT AGA CTT TTT		1005
Phe Trp Lys Ile Cys Val Glu His His Ala Phe Phe Arg Leu Phe		
305	310	315
GAA GAG CCC AAA CCA AAG CCC AAG CCC GTC CTC TTT AGC CGG GGG		1050
Glu Glu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Val Leu Phe Ser Arg Gly		
320	325	330
TCA TCA TTT CGG TTC AGT GGT CGG ACT CAG AAG CAG GTT CTC GAC		1095
Ser Ser Phe Arg Phe Ser Gly Arg Thr Gln Lys Gln Val Leu Asp		
335	340	345



TAT GTT AAA GAA GGA GGA CAT AAG AAG GTG CAG TTT GAA AGG AAG 1140  
Tyr Val Lys Glu Gly Gly His Lys Lys Val Gln Phe Glu Arg Lys  
350 355 360

CAC AGC AAG ATT CAT TCT ATC CGG AGC CTT GCT TCA CAG CCT ACA 1185  
His Ser Lys Ile His Ser Ile Arg Ser Leu Ala Ser Gln Pro Thr  
365 370 375

GAA CTG AAT TCG GAA GTG CTG GAG CAG TCT CAG CAG AGC ACC AGC 1230  
Glu Leu Asn Ser Glu Val Leu Glu Gln Ser Gln Gln Ser Thr Ser  
380 385 390

CTT ACA TTT GGA GAA GGT GCC GAA TCT CCA GGG GGC CAG AGC TGC 1275  
Leu Thr Phe Gly Glu Gly Ala Glu Ser Pro Gly Gly Gln Ser Cys  
395 400 405

CGG CGA GGA AAG GAA CCG AAG GTT TCC GCC GGG GAG CCG GGG TCG 1320  
Arg Arg Gly Lys Glu Pro Lys Val Ser Ala Gly Glu Pro Gly Ser  
410 415 420

CAC CCG AGC CCT GCG CCG AGG AGA AGC CCC GCG GGT AAC AAG CAG 1365  
His Pro Ser Pro Ala Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gly Asn Lys Gln  
425 430 435

GCG GAC GGA GCC GCC TCG GCG CCC ACG GAG GAA GAG GAG GAG GTC 1410  
Ala Asp Gly Ala Ala Ser Ala Pro Thr Glu Glu Glu Glu Glu Val  
440 445 450

GTT AAG GAT AGG ACC CAG CAG AGT AAA CCT CAG CCC CCG CAG CCA 1455  
Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Ser Lys Pro Gln Pro Pro Gln Pro  
455 460 465

\* AGC ACA GGC TCC CTG ACT GGC AGT CCT CAC CTT TCC GAG CTG TCT 1500  
Ser Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Pro His Leu Ser Glu Leu Ser  
470 475 480

GTG AAC TCG CAG GGG GGA GTG GCC CCT GCC AAC GTG ACC TTG TCT 1545  
Val Asn Ser Gln Gly Gly Val Ala Pro Ala Asn Val Thr Leu Ser

485	490	495	
CCC AAC CTG AGC CCC GAC ACC AAG CAG GCC TCT CCC TTG ATC AGC	1590		
Pro Asn Leu Ser Pro Asp Thr Lys Gln Ala Ser Pro Leu Ile Ser			
500	505	510	
CCG CTG CTG AAT GAC CAG GCC TGC CCC CGG ACG GAC GAT GAG GAT	1635		
Pro Leu Leu Asn Asp Gln Ala Cys Pro Arg Thr Asp Asp Glu Asp			
515	520	525	
GAG GGC CGG AGG AAG AGA TTC CCA ACT GAT AAA GCG TAC TTC ATA	1680		
Glu Gly Arg Arg Lys Arg Phe Pro Thr Asp Lys Ala Tyr Phe Ile			
530	535	540	
GCT AAG GAA GTG TCT ACC ACC GAG CGA ACA TAT CTG AAG GAT CTC	1725		
Ala Lys Glu Val Ser Thr Thr Glu Arg Thr Tyr Leu Lys Asp Leu			
545	550	555	
GAA GTT ATC ACT TCG TGG TTT CAG AGC ACA GTG AGC AAA GAG GAC	1770		
Glu Val Ile Thr Ser Trp Phe Gln Ser Thr Val Ser Lys Glu Asp			
560	565	570	
GCC ATG CCG GAA GCA CTG AAA AGT CTC ATA TTC CCG AAT TTT GAA	1815		
Ala Met Pro Glu Ala Leu Lys Ser Leu Ile Phe Pro Asn Phe Glu			
575	580	585	
CCT TTG CAC AAA TTT CAT ACT AAT TTT CTC AAG GAA ATT GAG CAA	1860		
Pro Leu His Lys Phe His Thr Asn Phe Leu Lys Glu Ile Glu Gln			
590	595	600	
CGA CTT GCC CTG TGG GAA GGC CGC TCA AAT GCC CAA ATC AGA GAT	1905		
Arg Leu Ala Leu Trp Glu Gly Arg Ser Asn Ala Gln Ile Arg Asp			
605	610	615	
TAC CAA AGA ATC GGC GAT GTC ATG CTG AAG AAC ATT CAG GGC ATG	1950		
Tyr Gln Arg Ile Gly Asp Val Met Leu Lys Asn Ile Gln Gly Met			
620	625	630	
AAG CAC CTG GCG GCT CAC CTG TGG AAG CAC AGC GAG GCC TTG GAG	1995		

Lys His Leu Ala Ala His Leu Trp Lys His Ser Glu Ala Leu Glu  
 635                      640                      645  
 GCC CTG GAG AAT GGA ATC AAG AGC TCC CGG CGG CTG GAG AAC TTC 2040  
 Ala Leu Glu Asn Gly Ile Lys Ser Ser Arg Arg Leu Glu Asn Phe  
 650                      655                      660  
 TGC AGA GAC TTT GAG CTG CAG AAG GTG TGT TAC CTA CCG CTC AAC 2085  
 Cys Arg Asp Phe Glu Leu Gln Lys Val Cys Tyr Leu Pro Leu Asn  
 665                      670                      675  
 ACC TTC CTC CTG CGG CCA CTG CAC CGG CTC ATG CAC TAC AAG CAG 2130  
 Thr Phe Leu Leu Arg Pro Leu His Arg Leu Met His Tyr Lys Gln  
 680                      685                      690  
 GTC CTG GAG CGG CTG TGC AAA CAC CAC CCG CCG AGC CAC GCC GAC 2175  
 Val Leu Glu Arg Leu Cys Lys His His Pro Pro Ser His Ala Asp  
 695                      700                      705  
 TTC AGG GAC TGC CGA GCC GCT TTG GCA GAG ATC ACG GAG ATG GTG 2220  
 Phe Arg Asp Cys Arg Ala Ala Leu Ala Glu Ile Thr Glu Met Val  
 710                      715                      720  
 GCA CAG CTC CAC GGT ACG ATG ATC AAG ATG GAG AAT TTC CAG AAG 2265  
 Ala Gln Leu His Gly Thr Met Ile Lys Met Glu Asn Phe Gln Lys  
 725                      730                      735  
 CTG CAC GAA CTC AAG AAA GAT TTG ATT GGC ATT GAC AAT CTT GTG 2310  
 Leu His Glu Leu Lys Lys Asp Leu Ile Gly Ile Asp Asn Leu Val  
 740                      745                      750  
 GTT CCG GGA AGG GAG TTC ATC CGT CTG GGC AGC CTC AGC AAG CTC 2355  
 Val Pro Gly Arg Glu Phe Ile Arg Leu Gly Ser Leu Ser Lys Leu  
 755                      760                      765  
 TCG GGG AAG GGG CTC CAG CAG CGC ATG TTC TTC CTG TTC AAC GAC 2400  
 Ser Gly Lys Gly Leu Gln Gln Arg Met Phe Phe Leu Phe Asn Asp  
 770                      775                      780

GTC CTG CTA TAC ACG AGC CGG GGG CTG ACG GCC TCC AAT CAG TTT 2445  
Val Leu Leu Tyr Thr Ser Arg Gly Leu Thr Ala Ser Asn Gln Phe  
785 790 795

AAA GTC CAC GGG CAG CTC CCG CTC TAT GGC ATG ACG ATT GAG GAG 2490  
Lys Val His Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Met Thr Ile Glu Glu  
800 805 810

AGC GAA GAC GAG TGG GGG GTG CCC CAC TGC CTG ACC CTC CGG GGC 2535  
Ser Glu Asp Glu Trp Gly Val Pro His Cys Leu Thr Leu Arg Gly  
815 820 825

CAG CGG CAG TCC ATC ATC GTG GCC GCC AGT TCT CGG TCC GAG ATG 2580  
Gln Arg Gln Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Ser Arg Ser Glu Met  
830 835 840

GAG AAG TGG GTT GAG GAC ATC CAG ATG GCC ATT GAC CTG GCG GAG 2625  
Glu Lys Trp Val Glu Asp Ile Gln Met Ala Ile Asp Leu Ala Glu  
845 850 855

AAG AGC AGC AGC CCC GCC CCT GAG TTC CTG GCC AGC AGC CCC CCT 2670  
Lys Ser Ser Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Ala Ser Ser Pro Pro  
860 865 870

GAC AAC AAG TCC CCT GAT GAA GCC ACC GCG GCT GAC CAG GAG TCA 2715  
Asp Asn Lys Ser Pro Asp Glu Ala Thr Ala Ala Asp Gln Glu Ser  
875 880 885

GAG GAT GAC CTG AGC GCC TCG CGC ACA TCG CTG GAG CGC CAG GCC 2760  
Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ser Arg Thr Ser Leu Glu Arg Gln Ala  
890 895 900

CCG CAC CGC GGC AAC ACA ATG GTG CAC GTG TGC TGG CAC CGC AAC 2805  
Pro His Arg Gly Asn Thr Met Val His Val Cys Trp His Arg Asn  
905 910 915

ACC AGC GTC TCC ATG GTG GAC TTC AGC ATC GCA GTG GAG AAT CAG 2850  
Thr Ser Val Ser Met Val Asp Phe Ser Ile Ala Val Glu Asn Gln

920 925 930  
 TTG TCT GGA AAC CTG CTG AGG AAA TTC AAA AAC AGC AAC GGG TGG 2895  
 Leu Ser Gly Asn Leu Leu Arg Lys Phe Lys Asn Ser Asn Gly Trp  
 935 940 945  
 CAG AAG CTG TGG GTG GTG TTC ACA AAC TTC TGC CTG TTC TTC TAC 2940  
 Gln Lys Leu Trp Val Val Phe Thr Asn Phe Cys Leu Phe Phe Tyr  
 950 955 960  
 AAA TCA CAC CAG GAC AAT CAT CCC CTT GCC AGC CTG CCT CTG CTC 2985  
 Lys Ser His Gln Asp Asn His Pro Leu Ala Ser Leu Pro Leu Leu  
 965 970 975  
 GGC TAC TCG CTC ACC ATC CCC TCT GAG TCC GAG AAC ATC CAG AAA 3030  
 Gly Tyr Ser Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser Glu Asn Ile Gln Lys  
 980 985 990  
 GAC TAC GTG TTC AAG CTG CAC TTC AAG TCC CAC GTC TAC TAC TTC 3075  
 Asp Tyr Val Phe Lys Leu His Phe Lys Ser His Val Tyr Tyr Phe  
 995 1000 1005  
 AGG GCG GAA AGC GAG TAC ACG TTC GAA AGG TGG ATG GAA GTG ATC 3120  
 Arg Ala Glu Ser Glu Tyr Thr Phe Glu Arg Trp Met Glu Val Ile  
 1010 1015 1020  
 CGC AGT GCC ACC AGC TCT GCC TCG CGA CCC CAC GTG TTG AGC CAC 3165  
 Arg Ser Ala Thr Ser Ser Ala Ser Arg Pro His Val Leu Ser His  
 1025 1030 1035  
 AAA GAG TCT CTT GTG TAT TGA TGGCCGGACA CACTCGTTTC CGCAGTGGCT 3216  
 Lys Glu Ser Leu Val Tyr  
 1040  
 GCTTTCCTGG AAGACGTTTC CTTTCTTCTG TATTAATGAA GCCTGGTAAA ATTAACACCT 3276  
 GTCTGAAAAAT CAAAAACATG GCTTCCCAGC AGCTCTCCTG TCTCCACAGC CGCGTTTTTT 3336  
 AACCCCGACC TCTCAGCGTT TGAATGAACA GCGCTCCCAC CTCCAGTCCT GGCATCCGCT 3396  
 GGGGGCGCTG TTCTTTAGCT AGTGCCAGTA TTA AACATT GTCATT 3442

配列番号：2

配列の長さ：

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Gly	Glu	Ile	Glu	Gln	Arg	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Leu	Gly
1				5					10					15
Ala	Pro	Glu	Asn	Ser	Gly	Ile	Ser	Thr	Leu	Glu	Arg	Gly	Gln	Lys
16				20					25					30
Pro	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Gly	Lys	Leu	Val	Ser	Ile	Lys	Ile	Gln
31				35					40					45
Met	Leu	Asp	Asp	Thr	Gln	Glu	Ala	Phe	Glu	Val	Pro	Gln	Arg	Ala
46				50					55					60
Pro	Gly	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Cys	Asn	His	Leu	Asn	Leu
61				65					70					75
Val	Glu	Gly	Asp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asp	His	Lys	Lys
76				80					85					90
Ile	Thr	Val	Trp	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	Pro	Ile	Val	Lys	Gln	Ile
91				95					100					105
Arg	Arg	Pro	Lys	His	Val	Val	Val	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Phe	Phe
106				110					115					120
Pro	Pro	Asp	His	Thr	Gln	Leu	Gln	Glu	Glu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu
121				125					130					135
Phe	Ala	Leu	Gln	Val	Lys	Gln	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly	Arg	Leu	Thr
136				140					145					150
Cys	Asn	Asp	Thr	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Ile	Ser	His	Ile	Val	Gln

151	155	160	165
Ser Glu Ile Gly Asp Phe Asp Glu Ala Leu Asp Arg Glu His Leu			
166	170	175	180
Ala Lys Asn Lys Tyr Ile Pro Gln Gln Asp Ala Leu Glu Asp Lys			
181	185	190	195
Ile Val Glu Phe His His Asn His Ile Gly Gln Thr Pro Ala Glu			
196	200	205	210
Ser Asp Phe Gln Leu Leu Glu Ile Ala Arg Arg Leu Glu Met Tyr			
211	215	220	225
Gly Ile Arg Leu His Pro Ala Lys Asp Arg Glu Gly Thr Lys Ile			
226	230	235	240
Asn Leu Ala Val Ala Asn Thr Gly Ile Leu Val Phe Gln Gly Phe			
241	245	250	255
Thr Lys Ile Asn Ala Phe Asn Trp Ala Lys Val Arg Lys Leu Ser			
256	260	265	270
Phe Lys Arg Lys Arg Phe Leu Ile Lys Leu Arg Pro Asp Ala Asn			
271	275	280	285
Ser Ala Tyr Gln Asp Thr Leu Glu Phe Leu Met Ala Ser Arg Asp			
286	290	295	300
Phe Cys Lys Ser Phe Trp Lys Ile Cys Val Glu His His Ala Phe			
301	305	310	315
Phe Arg Leu Phe Glu Glu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Val Leu			
316	320	325	330
Phe Ser Arg Gly Ser Ser Phe Arg Phe Ser Gly Arg Thr Gln Lys			
* 331	335	340	345
Gln Val Leu Asp Tyr Val Lys Glu Gly Gly His Lys Lys Val Gln			
346	350	355	360
Phe Glu Arg Lys His Ser Lys Ile His Ser Ile Arg Ser Leu Ala			
361	365	370	375

Ser Gln Pro Thr Glu Leu Asn Ser Glu Val Leu Glu Gln Ser Gln			
376	380	385	390
Gln Ser Thr Ser Leu Thr Phe Gly Glu Gly Ala Glu Ser Pro Gly			
391	395	400	405
Gly Gln Ser Cys Arg Arg Gly Lys Glu Pro Lys Val Ser Ala Gly			
406	410	415	420
Glu Pro Gly Ser His Pro Ser Pro Ala Pro Arg Arg Ser Pro Ala			
421	425	430	435
Gly Asn Lys Gln Ala Asp Gly Ala Ala Ser Ala Pro Thr Glu Glu			
436	440	445	450
Glu Glu Glu Val Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Ser Lys Pro Gln			
451	455	460	465
Pro Pro Gln Pro Ser Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Pro His Leu			
466	470	475	480
Ser Glu Leu Ser Val Asn Ser Gln Gly Gly Val Ala Pro Ala Asn			
481	485	490	495
Val Thr Leu Ser Pro Asn Leu Ser Pro Asp Thr Lys Gln Ala Ser			
496	500	505	510
Pro Leu Ile Ser Pro Leu Leu Asn Asp Gln Ala Cys Pro Arg Thr			
511	515	520	525
Asp Asp Glu Asp Glu Gly Arg Arg Lys Arg Phe Pro Thr Asp Lys			
526	530	535	540
Ala Tyr Phe Ile Ala Lys Glu Val Ser Thr Thr Glu Arg Thr Tyr			
541	545	550	555
Leu Lys Asp Leu Glu Val Ile Thr Ser Trp Phe Gln Ser Thr Val			
556	560	565	570
Ser Lys Glu Asp Ala Met Pro Glu Ala Leu Lys Ser Leu Ile Phe			
571	575	580	585
Pro Asn Phe Glu Pro Leu His Lys Phe His Thr Asn Phe Leu Lys			



586	590	595	600
Glu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Leu Trp Glu Gly Arg Ser Asn Ala			
601	605	610	615
Gln Ile Arg Asp Tyr Gln Arg Ile Gly Asp Val Met Leu Lys Asn			
616	620	625	630
Ile Gln Gly Met Lys His Leu Ala Ala His Leu Trp Lys His Ser			
631	635	640	645
Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Asn Gly Ile Lys Ser Ser Arg Arg			
646	650	655	660
Leu Glu Asn Phe Cys Arg Asp Phe Glu Leu Gln Lys Val Cys Tyr			
661	665	670	675
Leu Pro Leu Asn Thr Phe Leu Leu Arg Pro Leu His Arg Leu Met			
676	680	685	690
His Tyr Lys Gln Val Leu Glu Arg Leu Cys Lys His His Pro Pro			
691	695	700	705
Ser His Ala Asp Phe Arg Asp Cys Arg Ala Ala Leu Ala Glu Ile			
706	710	715	720
Thr Glu Met Val Ala Gln Leu His Gly Thr Met Ile Lys Met Glu			
721	725	730	735
Asn Phe Gln Lys Leu His Glu Leu Lys Lys Asp Leu Ile Gly Ile			
736	740	745	750
Asp Asn Leu Val Val Pro Gly Arg Glu Phe Ile Arg Leu Gly Ser			
751	755	760	765
Leu Ser Lys Leu Ser Gly Lys Gly Leu Gln Gln Arg Met Phe Phe			
766	770	775	780
Leu Phe Asn Asp Val Leu Leu Tyr Thr Ser Arg Gly Leu Thr Ala			
781	785	790	795
Ser Asn Gln Phe Lys Val His Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Met			
796	800	805	810

Thr Ile Glu Glu Ser Glu Asp Glu Trp Gly Val Pro His Cys Leu			
811	815	820	825
Thr Leu Arg Gly Gln Arg Gln Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Ser			
826	830	835	840
Arg Ser Glu Met Glu Lys Trp Val Glu Asp Ile Gln Met Ala Ile			
841	845	850	855
Asp Leu Ala Glu Lys Ser Ser Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Ala			
856	860	865	870
Ser Ser Pro Pro Asp Asn Lys Ser Pro Asp Glu Ala Thr Ala Ala			
871	875	880	885
Asp Gln Glu Ser Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ser Arg Thr Ser Leu			
886	890	895	900
Glu Arg Gln Ala Pro His Arg Gly Asn Thr Met Val His Val Cys			
901	905	910	915
Trp His Arg Asn Thr Ser Val Ser Met Val Asp Phe Ser Ile Ala			
916	920	925	930
Val Glu Asn Gln Leu Ser Gly Asn Leu Leu Arg Lys Phe Lys Asn			
931	935	940	945
Ser Asn Gly Trp Gln Lys Leu Trp Val Val Phe Thr Asn Phe Cys			
946	950	955	960
Leu Phe Phe Tyr Lys Ser His Gln Asp Asn His Pro Leu Ala Ser			
961	965	970	975
Leu Pro Leu Leu Gly Tyr Ser Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser Glu			
976	980	985	990
Asn Ile Gln Lys Asp Tyr Val Phe Lys Leu His Phe Lys Ser His			
991	995	1000	1005
Val Tyr Tyr Phe Arg Ala Glu Ser Glu Tyr Thr Phe Glu Arg Trp			
1006	1010	1015	1020
Met Glu Val Ile Arg Ser Ala Thr Ser Ser Ala Ser Arg Pro His			

1021                      1025                      1030                      1035  
Val Leu Ser His Lys Glu Ser Leu Val Tyr  
1036                      1040

配列番号 : 3

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CATACCGGTA AGTGGGGCAA GACTG 25

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TGCCCAGTTC AGGTCTCTTA 20

配列番号 : 5

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TGCTACTTCA TCGACCCCAT 20

配列番号 : 6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AAAGACCTCA CCCTCCATCT 20

配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GTCGATTACG TGGAGAGCTA 20

配列番号：8

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATGAACTTCT TCACCAGCTC 20

配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GTCAAGGCTG AGAACGGGAA 20

配列番号 : 10

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TCCACCACCC TGTTGCTGTA 20

配列番号 : 11

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

ATCAGACCCA GCTCCCAAAG 20

配列番号 : 12

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CACAGACCCA GCTCCCAAAC 20

配列番号 : 13

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCTTCAGGAA AACTCGTGTC 20

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TTGGAGTTGT GTGTGGTCAG 20

配列番号：15

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GCCAAAATAG TCACCTCCA CGAGG 25

配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCTTCAGGAA AACTCGTGTC 20

配列番号 : 16

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

AAACGRAAGA AYGTRTGRTG YTCWACACA 29

配列番号 : 17

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TTCCAGCTCC TAGAGATTGC 20

配列番号 : 18

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TCGTCTTCGC TCTCCTCAAT 20

配列番号 : 19

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

特平 9-342060

配列

CGGGTAACAA GCAGGCGGAC GGA 23



## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

CDEP cDNAの核酸塩基配列、および導かれるアミノ酸配列を示す図である。ここでエズリン様ドメインは白抜き枠で示される。また、Dblホモロジー (DH) ドメインは下線で示される。また、プレックストリンホモロジー (PH) ドメインは2重線で示される。タンパク質コード領域の下流の星印はストップコドンを示す。ポリ (A) 付加シグナルは点線で示されている。ポリ (A) 付加サイトは三角形で示されている。

## 【図2】

図2 (a) および (b) は、CDEP mRNAのノーザンブロット分析の結果を示す電気泳動写真である。Bt2cAMP存在、非存在下で培養されたヒト胎児軟骨細胞、種々のヒト胎児組織 (a)、および成人組織 (b) をホルムアルデヒド含有1%アガロースゲルで電気泳動した後ナイロンメンブレンに移した。メンブレンはCDEPプローブ (CDEP)、又はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプローブ (GAPDH) とハイブリダイズさせた。ここで、Ch-は、Bt2cAMP無処理繊維芽軟骨細胞、Ch+は、Bt2cAMP依存性分化軟骨細胞；Brは脳、Heは心臓；Liは肝臓；Spは脾臓；Inは腸；Luは肺、Teは精巣；Plは胎盤；Muは筋肉を示す。CDEP mRNAの大きさはkbで表されている。

## 【図3】

エズリン様、Dblホモロジー (DH) ドメインの配置と、ヒトCDEPのエズリン様ドメイン、エズリンおよびバンド4.1の比較を示す図である。ここでCDEPとの間で保存されている残基は、太字で示される。

## 【図4】

ヒトCDEPのDHドメインと、ヒトDbl、ラットOst、マウスEst2、およびヒトFGD1との比較を示す図である。ここでCDEPとの間で保存されている残基は、太字で示される。

## 【図5】

CDEPと他のタンパク質との関係を示す模式図である。エズリン様ドメイン、protein tyrosine phosphatase (PTP) ドメイン、Dblホモロジー (DH) ドメイン、

ン、およびプレックストリン (PH) ドメインが示されている。

【図6】

ヒト胎児軟骨細胞において、 $Bt_2cAMP$ に対応して発現する、タイプIIコラーゲン、アグリカン、軟骨マトリックスタンパク質 (CMP)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (上)、DEC1、およびCDEP (下) のmRNAのRT-PCR (reverse transcription PCR) 分析の結果を示す電気泳動写真である。ここで $Bt_2cAMP$ 存在 (cAMP+) 軟骨細胞から調製した全RNA、および $Bt_2cAMP$ 不存在 (cAMP-) 軟骨細胞から調製した全RNAが用いられた。

代理人弁理士 長谷川 芳樹

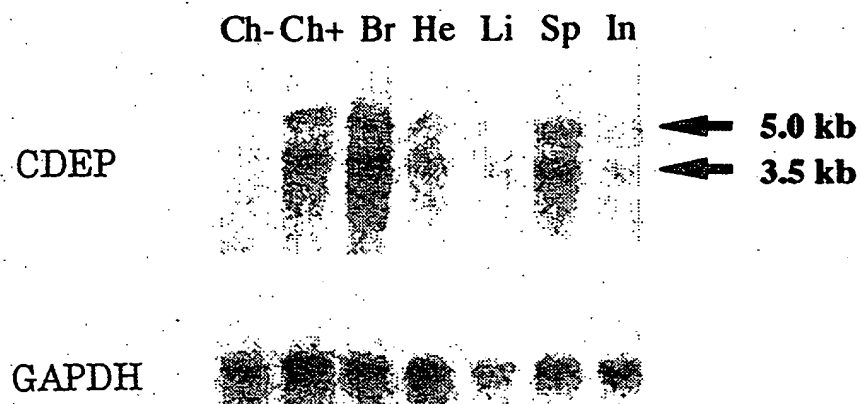
図面

[illegible]

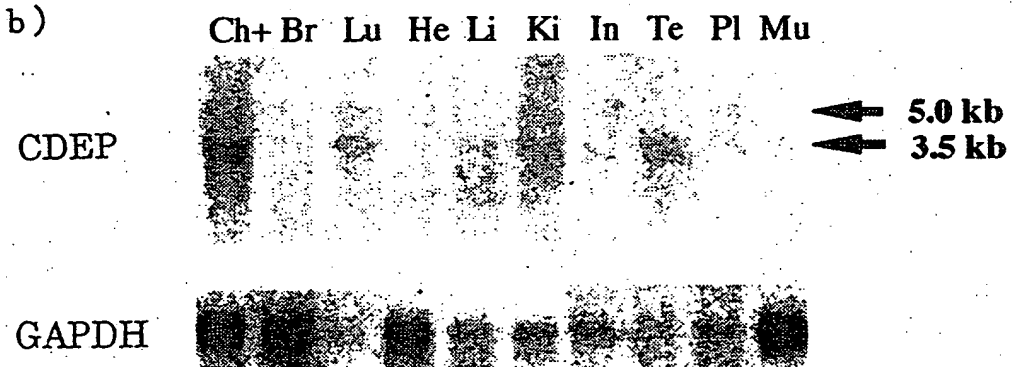
【图2】

图面代用写真

(a)



(b)



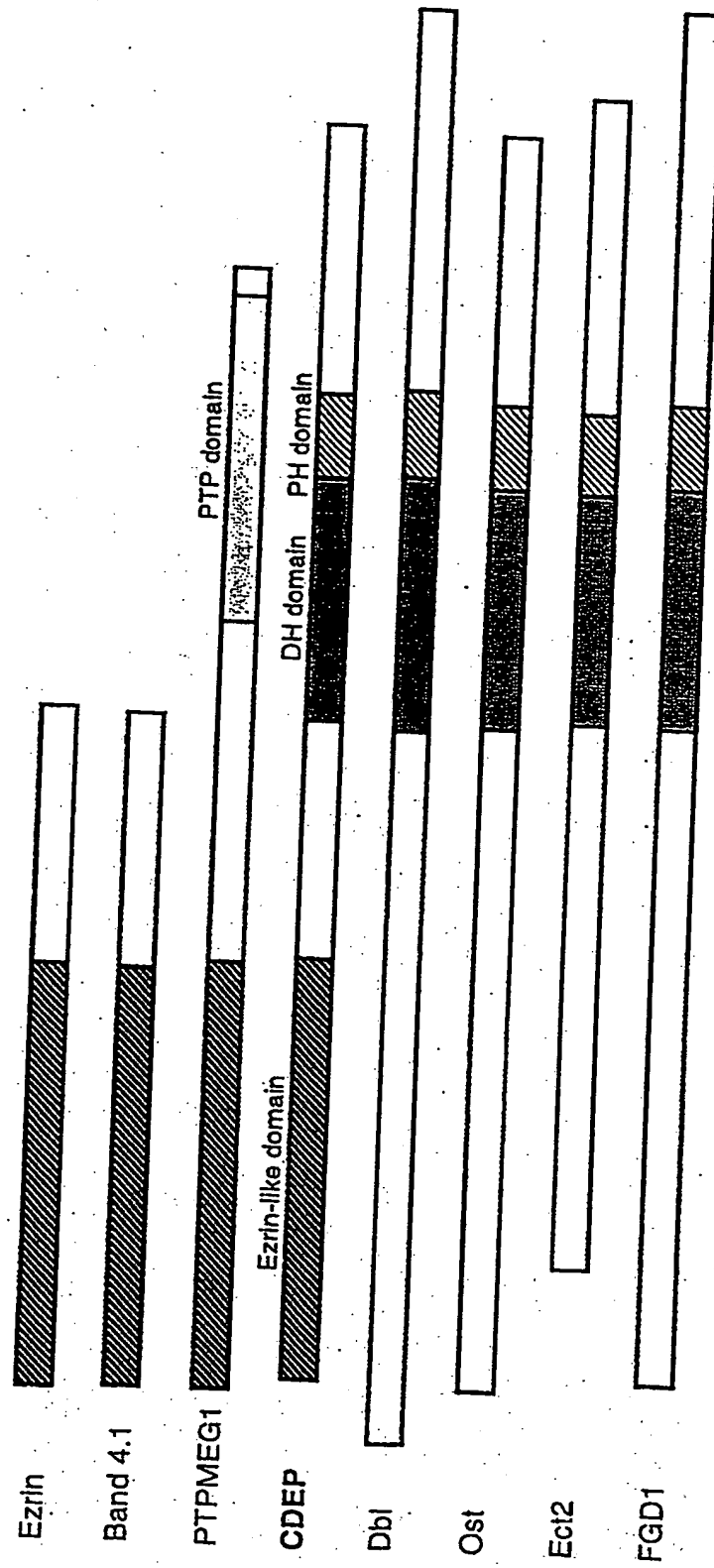
【图3】

CDEP	1	MGEIEQRPTPGSR LGAPENSGISTLERGQKPPPTPSGKLVSIKIQMLDDTQEA FEVPQ RAP.GKVL
Ezrin	1	.....MPKFINVRVT.....MDAELEFA..IQPNTTGKQL
Band 4.1	1	.....MCKVSLDDTTVEEC.VVEKHAKQDDL
CDEP	66	LDAVCNHLNVEGDYFGLFFPDHKKITVWDLLEKPIVQIRRPKHVVVK.FVVKFFPPDHTQLQEE
Ezrin	30	FDQVKTIGLREVWYFGLHYVDNKGFPWTLKDRKVSQAQEVKRNPLQFKRAKFPEDVAELIQ
Band 4.1	27	LKRVCEHLNLEEDYFGLAIWDNATSKTWLDSAKEIKKQ.VR.GVPWNFTFNKXFFYPDPDAQLTED
CDEP	131	LTRY.LFALQVKQDLAQORLTCDNTSAALLISHIVQSEIGDFD.EALDREHLAKNKYIPQQ.....
Ezrin	95	DITQKLFQVKEGILSDEIYCPCPETAVLIGSYAVQAQKFGDYNKEVHKSGYLSSERLIFQRMVDQH
Band 4.1	91	ITRYTLC.LQURQDIVAGRUPCSFATLALIGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAFNQ.....
CDEP	190	....DALEDKIVEFHNNHIGQTPAESDFQLLEIARRLMEYGI R LHPAKDREGTKINLAVANTGILV
Ezrin	161	KLTRDQWEDRIQVWHAHGRMLKDNAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLMLGVDALGLNI
Band 4.1	151	...TKELEKVMELHKSRYRSMTPAQADLEFLENAKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLV
CDEP	252	FOGFTKINA...FNWAKVRKLSFRKRFLIKLRPDANSAYQDTLEFLMASRDFCKSFWKICVEHHA
Ezrin	227	YEKDDKLT PKIGFPWSEIRNISFNDKKFVIKPIDKAPDF...VFYAPRLRINKRILQLCMGNHE
Band 4.1	214	YKDKLRINR...FPWPKVLKISYKRSSFFIKIRPGEQEQYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHT
CDEP	315	FFRLFEPPKPKPVLFSGSFRSGRTQKQVLDYVKEGHHKQV.FERKHSKIHISRS.L
Ezrin	289	LYMRRRKPD TIEVQKMAQAREKH...OKQLEROQLETKRRETVEREKEQMMREKEEL
Band 4.1	277	FFRLTS.TDTIPKSKFLALGSKFRYSGR TQAQTRQASALIDRPAPH.FERTASKRAS.RS.L

【图4】

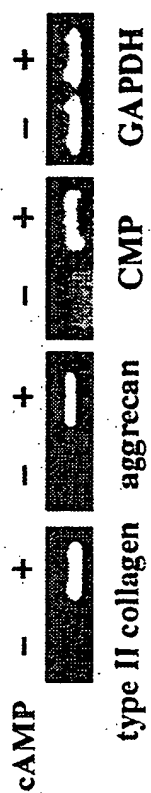
CDEP	544	I A K E V S T T E R T Y L K D L E V I T S N T Q S T V S K E . . . D A M P E A L . . . K S L I P N F E P L H K F H T N . F L K .
Dbl	499	V I N E L I Q T E R V Y V R E L Y T V L L G V R A E M D N P E M F D L M P L L R N K D I L F G N M A E I Y E F H N D I F L S .
Ost	446	V M N E L L D T E R A Y V E E L L C V L E G Y A A E M D N P L M A H L I S T G L Q N K N I L F G N M E E I Y H F H N R I F L R .
Ect2	281	V A K E L Y Q T E S N Y V N I L A T I I Q L F Q V P L E E G Q R G P I L A P E E I K T . I F G S I P D I F D V H M K I K D . .
FGD1	376	I A N E L L Q T E K A Y V S R L H L L D Q V F C A R L L E A . . R N R S S F P A D V V H G I F S N I C S I Y C F H Q Q . F L L P
CDEP	601	E I F Q R L A L W E G R S N A Q I R D Y Q R I G D V M L K N I Q G M K H L A A H L W K H S E A L E A L E N G I K S S R R L E N F C
Dbl	563	S I E N C A H A . . . . . P E R V G P C F L E R . K D D F Q M Y A K Y C Q N K P R S E T I W R K Y S E . . . . . C
Ost	510	E L E S C I D C . . . . . P E L V G R C F L E R . M E E F Q I Y E K Y C Q N K P R S E S L W R Q C S D . . . . . C
Ect2	343	D L E D L I A N W D E . . . . . S R S I G D I F L K Y A K D L V K T Y P P F V N F F E N S K E M I K C E K . . O K P R F H
FGD1	439	E L E K R M E E W D R . . . . . Y P R I G D I L Q K L A P F L K M Y G E Y V K N F D R A V E L V N T W T E R S T Q F K V I I
CDEP	666	R D F . E L Q K V C Y . . . L P L N T F L L P L H R L M H Y K Q V L . E R L C K H H P P S H A D F R D C R A A L A E I T E M V A
Dbl	609	A F F Q E C Q R K L K H R . L R L D S Y L K P V Q R I T K Y Q L L L K E . L L K Y S K D C E G S A . L L K K A L D A M L D L . .
Ost	556	P F F Q E C Q K L D H K . . L S L D S Y L K P V Q R I T K Y Q L L L K E . M L K Y S K H C E G A E . D L Q E A L S S I L G I . .
Ect2	400	A F L K I N Q A K P E C G R Q S L V E L L I R F V Q R L P S V A L L I N D . L K K T A D E N P D K S T L E K A I G S L K E V . .
FGD1	496	H . . . E V Q K E E A C G N L T L Q H H M L E P V Q R I P R Y E L L L K D Y L L K L P H G S . P D S K D A Q K S L E L I A T A . .
CDEP	726	Q L H G T M I K M E N F
Dbl	669	. . . . . L K S V N D
Ost	616	. . . . . L K A V N D
Ect2	460	. . . . . M T H I N D
FGD1	555	. . . . . A E H S N A

【図5】

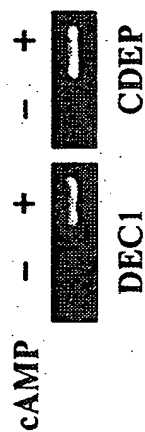


【图6】

図面代用写真



(a)



(b)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト軟骨細胞由来遺伝子を提供する。

【解決手段】 本発明に係るヒト軟骨細胞由来遺伝子によりコードされるタンパク質は、細胞膜上のタンパク質と結合する細胞骨格の調節因子であると同時に、Rhoの機能を調節する上位因子である特徴的構造を有する。すなわち、エズリン様ドメインと、DHドメインとPHドメインを共に有するものである。

【選択図】 図5

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000003311

【住所又は居所】

東京都北区浮間5丁目5番1号

【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100088155

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナシヨ

ナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】

長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】

100089978

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナシヨ

ナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】

塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】

100092657

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナシヨ

ナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】

寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】

100094318

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナシヨ

ナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】

山田 行一

【選任した代理人】

【識別番号】

100089901

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナシヨ

ナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】

吉井 一男

【選任した代理人】

【識別番号】

100107191

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナシヨ

ナルビル6階 創英国際特許事務所

【氏名又は名称】

長濱 範明

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号  
氏 名 中外製薬株式会社

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

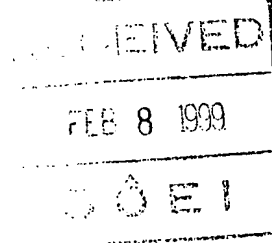
To:

HASEGAWA, Yoshiki  
Soei International Patent Firm  
6F., Kyobashi National Building  
13-10, Kyobashi 2-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 02 February 1999 (02.02.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference CGS 98-04 PCT	
International application No. PCT/JP98/05348	International filing date (day/month/year) 27 November 1998 (27.11.98)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 27 November 1997 (27.11.97)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.**
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.**

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
27 Nove 1997 (27.11.97)	9/342060	JP	22 Janu. 1999 (22.01.99)



The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

R. Forax

RF

Telephone No. (41-22) 338.83.38

002454273

CERTIFICATE OF VERIFICATION

I, Shiro TERASAKI  
Japanese Patent Attorney  
Registered No. 92657

of SOEI PATENT AND LAW FIRM  
Okura-Honkan, 6-12, Ginza 2-chome,  
Chuo-ku, Tokyo 104-0061 Japan

state that the attached documents are a true and complete  
translation to the best of my knowledge of Japanese Patent  
Application No. 342060/97.

Dated this 28th of February, 2002

Signature of translator: \_\_\_\_\_



Shiro TERASAKI

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following  
application as filed with this Office.

Date of Application: November 27, 1997

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 1997-342060

Applicant(s): CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

Commissioner,

Patent Office

(Seal)

[Name of Document] Application for Patent

[Reference Number] P97XX-074

[Filing Date] November 27, 1997

[Addressee] Director General of the Patent Office

[International Classification] C12N 15/00

[Title of the Invention] Human Fetus Chondrocyte-Derived  
Gene

[Number of Claims] 11

[Inventor]

[Name] Yukio KATO

[Address] 6-9-501, Ushitawaseda 3-chome, Higashi-ku  
Hiroshima, Japan

[Inventor]

[Name] Takeshi KAWAMOTO

[Address] 2580-17, Ajisu-cho, Yoshiki-gun,  
Yamaguchi, Japan

[Inventor]

[Name] Yasuhiko KOYANO

[Address] 14-24-405, Nishiasahi-machi, Minami-ku  
Hiroshima, Japan

[Applicant]

[ID Number] 000003311

[Name] CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

[Representative]

[ID Number] 100088155

[Patent Attorney]

[Name] Yoshiki HASEGAWA  
[Representative Appointed]  
[ID Number] 100089978  
[Patent Attorney]  
[Name] Tatsuya SHIODA  
[Representative Appointed]  
[ID Number] 100092657  
[Patent Attorney]  
[Name] Shiro TERASAKI  
[Representative Appointed]  
[ID Number] 100094318  
[Patent Attorney]  
[Name] Koichi YAMADA  
[Representative Appointed]  
[ID Number] 100089901  
[Patent Attorney]  
[Name] Kazuo YOSHII  
[Representative Appointed]  
[ID Number] 100107191  
[Patent Attorney]  
[Name] Hiroaki NAGAHAMA  
[Fee]  
[Deposit Account Number] 014708  
[Amount] 21,000  
[List of Documents Filed]  
[Name of Document] Specification 1



[Name of Document]	Drawings	1
[Name of Document]	Abstract	1

[Document Name]      Specification

[Title of the Invention]

Human Fetus Chondrocyte-Derived Gene

5            [ Claims ]

          [ Claim 1 ] A protein having an ezrin-like domain,  
a Dbl domain and a pleckstrin domain in one molecule.

          [ Claim 2 ] A protein having an amino acid sequence  
set forth in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing.

10            [ Claim 3 ] A protein comprising an amino acid sequence  
set forth in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing in which  
one to several amino acids have been deleted, substituted  
or added, wherein

          (1) an amino acid sequence of a portion of the protein  
15            corresponding to an amino acid sequence ranging from a 1<sup>st</sup>  
to a 374<sup>th</sup> amino acid in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing  
has a homology of 85% or more to an amino acid sequence ranging  
from a 1<sup>st</sup> to a 374<sup>th</sup> amino acid in the SEQ ID NO: 2,

          (2) an amino acid sequence of a portion of the protein  
20            corresponding to an amino acid chain ranging from a 544<sup>th</sup>  
to a 737<sup>th</sup> amino acid in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing  
has a homology of 85% or more to an amino acid sequence ranging  
from a 544<sup>th</sup> to a 737<sup>th</sup> amino acid in the SEQ ID NO: 2, and

          (3) an amino acid sequence of a portion of the protein  
25            corresponding to an amino acid chain ranging from a 764<sup>th</sup>  
to an 854<sup>th</sup> amino acid in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing

has a homology of 85% or more to an amino acid sequence ranging from a 764<sup>th</sup> to an 854<sup>th</sup> amino acid in the SEQ ID NO: 2.

[ Claim 4 ] DNA encoding a protein according to any one of Claims 1 to 3.

5 [ Claim 5 ] DNA comprising a base sequence ranging from a 49<sup>th</sup> to a 3183<sup>rd</sup> base in a base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

[ Claim 6 ] DNA hybridized under stringent conditions with DNA according to Claim 5.

10 [ Claim 7 ] DNA comprising a base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

[ Claim 8 ] DNA comprising a base sequence ranging from a 49<sup>th</sup> to a 3183<sup>rd</sup> base in a base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

15 [ Claim 9 ] An antibody against the protein according to any one of claims 1 to 3.

[ Claim 10 ] A method for screening a regulator of cell differentiation induction using a protein according to any one of Claims 1 to 3.

20 [ Claim 11 ] A method for screening an anti-tumor agent using a protein according to any one of Claims 1 to 3.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field to which the Invention Pertains]

5 This invention relates to a gene expressed specifically  
in differentiated human chondrocytes, a protein encoded by  
the gene, and an antibody against the protein.

[0002]

[Prior Art]

10 It [sic] is indispensable in analyzing the  
differentiation of cartilage and the mechanism of  
transmutation, and important in the development of gene  
therapy for degenerative joint disease, chronic rheumatism  
and the like. No methods for the monolayer culturing of human  
chondrocytes in a differentiated state have been established,  
15 so that the search for a gene specifically expressed in  
chondrocytes in a differentiated state and the analysis of  
the properties of a protein encoded by a gene have  
conventionally been inadequate.

[0003]

20 Recently, however, the inventors of the present  
invention have established a method for the monolayer  
culturing of human chondrocytes in a differentiated state  
(M. Shen, T. Kawamoto,

25 W. Yan, K. Nakamasu, M. Tamagami, Y. Koyano, M. Noshiro,  
and Y. Kato, "Biochemical and Biophysical Research  
Communications 236, 294-298 (1977)), and the search for a

gene specifically expressed in chondrocytes in a differentiated state derived from a human using the culture method and a description of the properties of a protein encoded by the gene has been strongly desired.

5 [0004]

[ Problems to be Solved by the Invention ]

A main object of the present invention is to acquire a novel gene specifically expressed in chondrocytes in a differentiated state using a method for the monolayer  
10 culturing of the aforementioned chondrocytes in a differentiated state derived from a human.

[0005]

[ Means for Solving the Problems ]

The inventors of the present invention have carried  
15 out a search for a gene whose expression between a differentiated chondrocyte and a dedifferentiated chondrocyte is different using a method for cultivating chondrocytes in a differentiated state as already reported, have discovered a gene specifically expressed in the former  
20 chondrocyte, and have completed the present invention.

[0006]

More specifically, the present invention provides a protein having an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing.

25 [0007]

The invention also provides a protein comprising the

amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing in which one to several amino acids have been deleted, substituted or added, and the protein being such that (1) an amino acid sequence of a portion of the protein corresponding to an amino acid sequence ranging from the 1st to 374th amino acids in SEQ ID NO: 2 has homology of 85% or more to the amino acid sequence ranging from the 1st to 374th amino acids in the SEQ ID NO: 2, (2) an amino acid sequence of a portion of the protein corresponding to an amino acid sequence ranging from the 544th to 737th amino acids in SEQ ID NO: 2 has homology of 85% or more to the amino acid sequence ranging from the 544th to 737th amino acids in the SEQ ID NO: 2, and (3) an amino acid sequence of a portion of the protein corresponding to an amino acid sequence ranging from the 764th to 854th amino acids in SEQ ID NO: 2 has homology of 85% or more to the amino acid sequence ranging from the 764th to 854th amino acids in the SEQ ID NO: 2.

[0008]

Further, the present invention also provides DNA encoding the protein mentioned above.

[0009]

Further, the present invention also provides DNA comprising a base sequence ranging from a 49th to a 3183rd base in a base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

[0010]

Further, the present invention also provides DNA hybridized under stringent conditions with DNA mentioned above.

5 [0011]

Further, the present invention also provides DNA comprising a base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

10 Further, the present invention also provides DNA comprising a base sequence ranging from a 49th to a 3183rd base in a base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

[0012]

15 Further, the present invention also provides an antibody against the aforementioned protein according to the present invention.

[0013]

20 In further detail, an amino acid sequence for a protein according to the present invention includes three domains, those being an ezrin-like domain, a Dbl homology (DH) domain, and a pleckstrin homology (PH) domain in order from the N-terminus in one molecule. Accordingly, this novel protein has the potential to be an extremely important factor in controlling the activity of an Rho family existing near the cell membrane and regulating the functions of the actin-based  
25 cytoskeleton responsible for the maintenance of cell shape

and motility.

[0014]

It becomes possible, moreover, to develop a drug  
for regulating cell differentiation induction or the  
proliferation of cancer, by activating or inhibiting the  
function of the protein according to the invention.

[0015]

[Embodiments of the Invention]

Embodiments for the present invention are described  
below.

[0016]

An amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2 in  
the sequence listing is derived from DNA discovered by the  
invention that is set forth in SEQ ID NO: 1 in the sequence  
listing, and became known for the first time as a result  
of searching for a gene expressed specifically in  
chondrocytes in a differentiated state as set forth in the  
embodiments described below. The protein having this derived  
amino acid sequence is called CDEP in the present  
specification.

[0017]

The total nucleotide sequence of the gene encoding  
the CDEP (the gene will be referred to as CDEP cDNA) is  
described in SEQ ID NO: 1 in the sequence listing. The  
correspondences with amino acids deduced from the resulting  
nucleotide sequence are set forth in SEQ ID NO: 1 in



the sequence listing, and Fig. 1 (amino acids are showed as three characters).

[0018]

5 CDEP cDNA includes an open reading frame of 3135 bp starting with the first ATG codon existent on the 49th nucleotide. Since an in-frame stop codon is present upstream from the 5'-region (the 34th nucleotide), moreover, the first ATG is defined as an initiation codon.

[0019]

10 Thus, CDEP is assumed to comprise 1,045 amino acid residues, and its molecular weight is calculated at 118.6 kDa.

[0020]

15 The amino acid sequence of CDEP derived from the aforementioned base sequence is mentioned in SEQ ID NO: 2 in the sequence listing and in FIG. 1. Based on the obtained amino acid sequence, the amino acid sequence is found to lack a signal peptide for secretion and a hydrophobic region of a transmembrane or membrane-bound domain.

20 [0021]

At least three polyadenylation signals and polyadenylation sites are found to exist (Fig. 1). The total length of 3287 bp, 3306 bp or 3442 bp, excluding the poly(A) tract, is consistent with the size of mRNA (3.5 kb, indicated by an arrow as 3.5 kb in Fig. 2(a)) determined by northern blotting analysis to be described below.

25

[0022]

The results of a homology search of the derived amino acid sequence using a protein database shows that the CDEP of the present invention includes the three functional domains of an ezrin-like [sic] domain, a DH domain, and a PH domain (FIGS. 1, 3, and 4). No protein had been known before having an ezrin-like domain, DH domain and a PH domain; the CDEP according to the present invention is the first such example.

[0023]

The ezrin-like domain that CDEP has refers to the one conserved in a band 4.1 superfamily, including ezrin, radixin, moesin, and band 4.1 that have been known. Fig. 3 shows the homology of the ezrin-like domain of CDEP to them. It can be seen that the ezrin-like domain of CDEP has homology of 27.5% to ezrin, and homology of 43.7% to band 4.1.

[0024]

Ezrin and other such proteins are believed to play the role of a linker protein between the cytoskeleton and the cell membrane. Recently, a number of proteins have been reported having an ezrin-like domain in the N-terminal region, and among these proteins, merlin is known to be a tumor suppressor molecule which is a cause of neurofibroma type 2, and PTPMEG1 and PTPH1 are known to be members of a cytoplasmic protein tyrosine phosphatase (PTP) family.

[0025]

These proteins are known to take part in the transmission of signals from outside of the cell to the inside of the cell at the boundary between the cell membrane and the cytoskeleton. A notable fact is that ezrin, radixin, and moesin (these are called ERM proteins) bind to a cytoplasmic domain of CD44, a hyaluronate receptor, through their N-terminal region. Also noticeable is that the binding of the ERM proteins to CD44 is enhanced by GTP  $\gamma$ S, and markedly suppressed by C3 toxin, a specific inhibitor of Rho. As noted from these facts, GTP-Rho is required for the formation of a CD44/ERM protein complex.

[0026]

Further, CDEP also has the DH and PH domains. The Rho GEF family, including Dbp, Ost, Ect2 and Lbc which are oncogene products, and FGD1 which is a causative gene for faciogenital dysplasia, also includes the DH domain, and is known to be bound directly to the PH domain (DH-PH sequence) at the C-terminus; the homology of the CDEP in terms of the DH domain is 22.9% for Dbp, 22.9% for Ost, 22.3% for Ect2, and 25.6% for FGD1 (FIG. 4).

[0027]

Here, Rho GEF is known to convert GDP-Rho (inactive type), in particular, into GTP-Rho (active type), while Ras GEFs are known to convert GDP-Ras into GTP-Ras.

[0028]

Rho and Ras belong to a small GTP-binding protein

superfamily, and are known to take part in intracellular signal transduction. The superfamily is divided into five subfamilies, i.e., Ras, Rho, Rab, Arf, and other. The Rho subfamily (Rho, Rac, and Cdc42) is known to control the morphology, migration, aggregation and adhesion of cells by contraction of actin filaments. It is also known that some regulators of Rho, such as GEFs and GTPase-activating proteins (GAPs), are present upstream in the Rho cascade.

[0029]

It is further known that the DH-PH domain is necessary for Rho GEF activity, while the Cdc-25 domain is necessary for Ras GEF activity; some of Ras GEF family members, such as Ras-GRF and Sos, have Ras GEF activity, but have no Rho GEF activity, even though they have DH-PH domain in addition to Cdc-25 domain.

[0030]

The CDEP according to the present invention has no Cdc-25 domain but includes the DH-PH domain as set forth above, so the CDEP is thought to be a member of the Rho GEF family rather than the Ras GEF family.

[0031]

The ERM proteins having the ezrin-like domain are known to be involved in signal transduction leading to morphological changes of cells through the formation of a CD44/ERM/actin complex. Formation of this complex requires the activity of Rho by Rho GEF. CDEP obtained in the

invention is found to be a very unique protein containing an ezrin-like domain and an Rho GEF-like domain in one molecule (Fig. 5). This is suggestive of a possibility that this substance will modify signal transduction in the CD44 path and/or a path mediated by other receptor. Furthermore, many members of the Rho GEF family become oncogenes for lack of the N-terminal region. This finding suggests that CDEP plays an important role in controlling the adhesion, diffusion, migration, proliferation, and differentiation of cells, including chondrocytes.

[0032]

Therefore, the CDEP protein of the invention includes not only a protein having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2, but also a protein having a novel amino acid sequence comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO. 2 in which one to several amino acids have been deleted, substituted or added, the novel amino acid sequence having an ezrin-like domain, a DH domain, and a PH domain in the molecule. Particularly, the CDEP protein includes a protein in which an amino acid sequence ranging from the 1st to 373rd amino acids in SEQ ID NO: 2 (called ezrin-like domain) has homology of 70% or more (preferably 85% or more) to the amino acid sequence of the SEQ ID NO: 2, in which an amino acid sequence ranging from the 544th to 737th amino acids in SEQ ID NO: 2 (called DH domain) has homology of 70% or more (preferably 85% or more) to the amino acid sequence of the

SEQ ID NO: 2, and in which an amino acid sequence ranging from the 764th to 854th amino acids in SEQ ID NO: 2 (called PH domain) has homology of 70% or more (preferably 85% or more) to the amino acid sequence of the SEQ ID NO: 2.

5 [0033]

The protein having such amino acid sequences has substantially the same domains as ezrin-like, DH and PH domains characteristic of CDEP, and is thus presumed to have substantially the same biochemical functions as does CDEP.

10 [0034]

Further, the DNA according to the present invention comprises not only an amino acid sequence for encoding the aforementioned CDEP, but also the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 in which one to several amino acids have been deleted, substituted or added; and the DNA according to the present invention also includes DNA for encoding a protein having a novel amino acid sequence having an ezrin-like domain, and DH and PH domains in the molecule. Particularly, the aforementioned DNA includes DNA for encoding a protein in which the amino acid sequence ranging from the 1<sup>st</sup> to the 373<sup>rd</sup> amino acids in SEQ ID NO: 2 (ezrin-like domain) has 85% or more homology with the amino acid sequence in SEQ ID NO: 2, and the amino acid sequence ranging from the 544<sup>th</sup> to the 737<sup>th</sup> amino acids in SEQ ID NO: 2 (DH domain) has 85% or more homology with the amino acid sequence in SEQ ID NO: 2, and the amino acid sequence ranging from the

764<sup>th</sup> to the 854<sup>th</sup> amino acids in the SEQ ID NO: 2 (PH domain) has 85% or more homology with the amino acid sequence in the SEQ ID NO: 2.

[0035]

5           The DNA "encoding or coding for a protein" refers to DNA, if double-stranded, in which one of the complementary two strands has a nucleotide sequence coding for the protein.

[0036]

10           Replacement, deletion and insertion of an amino acid sequence can be caused by introducing a mutation such as replacement, deletion, or insertion of a nucleotide in the base sequence using a publicly known method such as site-specific mutagenesis, and such a method can easily be chosen by a person skilled in the art.

15           [0037]

          To obtain a protein according to the present invention, production with an ordinary genetic engineering technique or the like may be used.

[0038]

20           The DNA of the present invention includes DNA comprising a base sequence ranging from the 49<sup>th</sup> to the 3183<sup>rd</sup> amino acid in the base sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or a base sequence complementary thereto.

[0039]

25           Further, the invention includes DNA hybridized under stringent conditions with the aforementioned DNA.

[0040]

Stringent conditions refer to those under which a so-called specific hybrid is formed, and a non-specific hybrid is not formed. While it is difficult to express these conditions clearly as numerical values, one example of conditions may be given wherein the temperature is in a range from the  $T_m$  of a hybrid of nucleic acids with a high homology, e.g., a hybrid with completely matching nucleic acids, to 20°C lower than the  $T_m$ , or where DNAs having 80% or higher homology are hybridized and nucleic acids with lower homology are not hybridized.

[0041]

The aforementioned DNA according to the present invention can be synthesized on the basis of one of the base sequences determined by the invention as indicated in the Embodiments below. The DNA can also be obtained from chromosomal DNA by hybridization or PCR using a probe or an oligonucleotide primer prepared based on the base sequence. Alternatively, the DNA can be obtained by carrying out RT-PCR using cartilage mRNA, and screening the cartilage or other cDNA library using a polynucleotide having a base sequence encoding all or part of DEC1 as a probe.

[0042]

Further, the aforementioned protein according to the present invention can be produced by inserting the DNA of the present invention into a publicly known expression vector



to construct a recombinant plasmid, introducing this  
recombinant plasmid into a cell to obtain a transformant,  
culturing the transformant in a suitable medium, causing  
the protein of the present invention to form and accumulate  
5 in the culture, and collecting the protein from the culture.

[0043]

A host-vector system ordinarily used in the expression  
of a foreign protein may be used as the cell and expression  
vector; examples that may be given are combinations of  
10 prokaryotic cells such as *Escherichia coli* and suitable  
expression vectors, and of eucaryotic cells such as mammalian  
cells and suitable expression vectors. The culture media  
and culture conditions may be selected arbitrarily according  
to the cells used.

15 [0044]

The protein of the present invention may be expressed  
as a fusion protein combined with another protein. The entire  
length of the protein of the present invention may be  
expressed, or a part may be expressed as a partial peptide.

20 [0045]

The culture refers to a culture medium and cells in  
the culture medium; collection of the protein of the present  
invention from the culture can be carried out with a publicly  
known purification method for proteins using the activity,  
25 etc., of the aforementioned protein of the present invention  
as an indicator.

[0046]

An antibody which can bind to the protein according to the present invention (hereinafter, referred to as the antibody of the invention) can be prepared according to a customary method using the protein of the present invention as an antigen. The antigen of the present invention may be polyclonal or monoclonal.

[0047]

The protein of the present invention may be used unchanged as an antigen, but it is preferably used as an antigen after being joined to a carrier protein such as keyhole limpet hemocyanin, bovine serum albumin or ovalbumin, and/or in combination with an adjuvant.

[0048]

The polyclonal antibody may be obtained by immunizing an animal such as a mouse, rabbit, guinea pig or sheep with a subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous injection of the aforementioned antigen, and collecting serum from the immunized animal.

[0049]

The monoclonal antibody may be obtained, for example, in the following manner. After immunizing an animal such as a mouse, rabbit, guinea pig, or sheep with a subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous injection of the aforementioned antigen, the spleen or lymph node is removed, a cell removed therefrom is fused with a myeloma cell derived

preferably from an animal the same type as the immunized animal to obtain a hybridoma, and a cell strain which continuously produces from the resulting hybridoma antibodies specific to the aforementioned antigen is selected by repeated screening and cloning. The cell strain thus selected is cultured in a suitable medium to produce monoclonal antibodies in the medium. Alternatively, the cell strain may be cultured *in vivo* such as intraperitoneally in the mouse to produce antibodies in ascitic fluid or the like.

[0050]

Methods for purification of the resulting polyclonal and monoclonal antibodies include salting out with ammonium sulfate, ion exchange chromatography using a DEAE cellulose column or the like, affinity chromatography using a protein A column or the like, and immunoabsorbent chromatography. The antibody of the present invention can be detected with a method such as immunoassay using the protein of the present invention and a labeled antibody.

[0051]

The antibody of the present invention may be fragmented as long as the antigen-binding site (Fab) is conserved. A concrete example of the fragmented antibody is a fragment containing Fab obtained by decomposing the antibody with a protease such as papain which does not decompose the antigen-binding site.

[0052]

The antigen of the present invention may be labeled by being joined to a labeling substance. The labeling substance is not particularly restricted if normally useable for labeling a protein, and examples such as enzymes, isotopes, and fluorescent materials may be given.

[0053]

In concrete terms, a method of screening a regulator of cell differentiation induction according to the present invention using a protein according to the present invention may, for example, comprise adding the substance in question to a cell having differentiation potency such as tetracarcinoma, and investigating what actual changes occur in the cell such as whether the cell differentiated based on the shape of the cell and/or the expression of a marker gene. An alternate method of screening according to the invention is to add various chemically synthesized medical agents to the cell, and search for agents which can change the amount of expression of CDEP.

[0054]

Concretely, a method of screening an anti-tumor agent according to the present invention using the protein according to the present invention may, for example, comprise adding various chemically synthesized medical agents to cells cancerized by introduction of the CDEP cDNA deficient

on the N-terminal side, and searching for medical agents that have restored the cell to normal.

[0055]

#### Examples

5           The present invention will now be described with reference to Examples to be offered below.

[0056 ]

PCR primers used in the Examples were synthesized by an ordinary automatic method of synthesis.

10           [0057]

For type II collagen: CATACCGGTAAGTGGGGCAAGACTG,  
TGCCCAGTTCAGGTCTCTTA

For aggrecan: TGCTACTTCATCGACCCCAT, AAAGACCTCACCTCCATCT

For CMP: GTCGATTACGTGGAGAGCTA, ATGAACTTCTTCACCAGCTC

15           For GAPDH: GTCAAGGCTGAGAACGGGAA, TCCACCACCCTGTTGCTGTA

For DEC1: ATCAGACCCAGCTCCCAAAG, CACAGACCCAGCTCCCAAAC

For CDEP: CCTTCAGGAAAACCTCGTGTC, TTGGAGTTGTGTGTGGTCAG

For CDEP cDNA fragment: GCCAAAATAGTCACCTTCCACGAGG,

CCTTCAGGAAAACCTCGTGTC, AAACGRAAGAAYGTRTGRTGYTCWACACA,

20           TTCCAGCTCCTAGAGATTGC, TCGTCTTCGCTCTCCTCAAT,

CGGGTAACAAGCAGGCGGACGGA

#### (Example 1)

25           Culture of differentiated chondrocytes was performed in the following manner in accordance with the method described in Biochemical and Biophysical Research

Communications 236, 294-298 (1997), M. Shen, T. Kawamoto, W. Yan, K. Nakamasu, M. Tamagami, Y. Koyano, M. Noshiro, and Y. Kato:

[0058]

5           From a human fetus spontaneously aborted at about 25 weeks of pregnancy (obtained from Norman Bethune University of Medical Sciences), an epiphysical cartilage on the femur side of the knee joint was obtained. From this cartilage, chondrocytes were isolated by the same method as described  
10           in Simomura et al. (1975), Calcif. Tissue Res. 19, 179-187, except that cartilage slices were incubated for 3 hours in an  $\alpha$ -modified Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM) containing 3 mg/ml of collagenase (type IA, Sigma). The obtained cells were seeded on type I collagen coated dishes at a density of  $1 \times 10^5$   
15           cells/dish. The cells were cultured in  $\alpha$ -MEM (10 ml/dish) containing 10% bovine fetal serum, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 32 units/ml of penicillin, and 40  $\mu$ g/ml of streptomycin. When the cells became subconfluent, dibutyryl cAMP (dbcAMP) (1 mM) was added to the culture medium. The cells were  
20           cultured for 2 weeks or more in the presence and absence of dbcAMP, and then morphological observation of the cells was made. Also, the cells were harvested, fixed with ethanol, and stained with toluidine blue.

[0059]

25           The chondrocytes cultured in the presence of dbcAMP took a spherical form, and were rich in extracellular matrix.

Whereas the chondrocytes cultured in the absence of dbcAMP were spindle-shaped, similar to fibroblasts, and deficient in extracellular matrix.

[0060]

5           Staining with toluidine blue, which selectively stains sulfated proteoglycan, satisfactorily stained the chondrocytes cultured in the presence of dbcAMP, but scarcely stained the chondrocytes cultured in the absence of dbcAMP.

[0061]

10           The expression of mRNA of type II collagen, aggrecan and CMP as molecule markers was examined by RT-PCR. The expression of the molecule marker in the presence of dbcAMP was compared with that in the absence of dbcAMP. It was suggested tat a differentiated state was maintained in the  
15           presence of dbcAMP (Fig. 6).

[0062]

Thus, the chondrocytes cultured in the presence of dbcAMP were admitted to maintain a differentiated state as cartilage, namely, a differentiated phenotype.

20           [0063]

The above effect of dbcAMP was examined for dose dependency. This effect was found to increase dose dependently, and peaked at 0.3 to 0.5 mM.

[0064]

25           Chondrocytes were cultured in the same manner as described above, except that bFGF (0.4 ng/ml) and TGF- $\beta$  (3

ng/ml) were used instead of dbcAMP. bFGF and TGF- $\beta$  are reported to stabilize or stimulate the expression of the differentiated phenotype of rabbit and chicken chondrocytes. The expression of the differentiated phenotype of the human-derived chondrocytes was not maintained with the use of bFGF and TGF- $\beta$ .

[0065]

(Example 2) Gene specifically expressed in chondrocytes in a differentiated state

From the chondrocytes cultured in the presence of dbcAMP and in the absence of dbcAMP as described in Example 1, total RNA was extracted by the guanidine thiocyanate/cesium trifluoroacetate method. Poly(A)<sup>+</sup>RNA was concentrated using Oligotex-dT30 (Roche). Clones encoding mRNA, which is expressed in differentiated chondrocytes (+dbcAMP), but not in dedifferentiated chondrocytes (-dbcAMP), were selected by subtractive hybridization. cDNA derived from mRNA of the differentiated chondrocytes was hybridized with an excess amount of cDNA derived from mRNA of the dedifferentiated chondrocytes, by use of PCR Select cDNA Subtraction Kit (Clontech). cDNA which does not hybridize, that is which expresses in a differentiated state was amplified by suppression PCR according to an instruction manual of the manufacturer. The resulting PCR product was cloned into a T tail vector pGEM-T (Promega), and nucleotide sequencing



of about 120 clones was performed. For further analysis, one clone was selected, and the corresponding protein product was named CDEP.

[0066]

5            Fig. 2A and Fig. 2B show the results of northern blotting analysis of CDEP mRNA expression in various human fetal tissues by the use of a 1.6 kb fragment of CDEP as the probe. Here, the transcript of 5.0 kb was also detected by northern blotting analysis. This finding suggests that  
10           in addition to the PCR product derived from 3.5 kb mRNA, a larger band induced from 5.0 kb mRNA probably hybridizable with the CDEP probe was found in RACE-PCR as well (No result is shown here). However, the nucleotide sequencing of the product corresponding to the transcript of 5.0 kb has not  
15           been performed yet.

[0067]

            The expression pattern of CDEP mRNA in cultured chondrocytes and various human tissues by northern blotting analysis showed that two main bands, 3.5 kb and 5.0 kb, were  
20           detected in cyclic AMP dependent differentiated chondrocytes, as illustrated in Fig. 2A, but they were not detected in fibroblasts without cyclic AMP. In fetal tissues, the highest level of CDEP mRNA was observed in the brain and the spleen, and low to intermediate levels of CDEP  
25           mRNA were noted in the heart, liver and intestine (Fig. 2A). In adult tissues, the amount of expression was intermediate

in the kidney, testis, and lung, and considerably small in the heart, liver and intestine (Fig. 2B).

[0068]

Northern blotting was performed in the following manner: The total RNA (10  $\mu$ g) was electrophoresed on a 1% agarose gel containing formaldehyde, and transferred onto Hybond-N Membrane (Amersham). To examine the tissue distribution, total RNA of various fetal human tissues were supplied by Dr. Li Yu of Norman Bethune University of Medical Sciences. A 1.6 kb fragment of CDEP was labeled with [<sup>32</sup>P]dCTP, and used as a hybridization probe. The membrane was washed with 0.2 $\times$  SSC containing 0.5% SDS for 30 minutes at 65°C. A biomax X-ray film was exposed to light through the washed membrane using a sensitizing film at -70°C.

[0069]

Nucleotide sequencing of the full length of CDEP cDNA was performed in the following manner: CDEP full length cDNA was isolated by the rapid amplification cDNA ends (RACE) method using Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech). In detail, double-stranded cDNA was joined to Marathon cDNA adaptor, and subjected to suppression PCR. The reaction was carried out using an adaptor primer, and a gene specific primer designed for CDEP on the basis of the nucleotide sequence of CDEP. The amplified cDNA sample was separated using a 4% polyacrylamide gel, and DNA of major bands was extracted from the gel and subcloned into pGEM-T. The

subcloned plasmid double-stranded DNA and a series of synthetic oligonucleotides were used as a sequencing template and specific primers, respectively. DNA sequencing was performed by the Sanger method using Sequenase 7-deaza-dGTP DNA Sequencing Kit (Amersham), or ABI PRISM 310 Autosequencer (Perkin Elmer).

[0070]

The so determined nucleotide sequence of CDEP cDNA and an amino acid sequence deduced therefrom are set forth in SEQ ID NO: 1. Only the amino acid sequence is set forth in SEQ ID NO: 2. CDEP cDNA has an open reading frame of 3135 bp. The length of 3287 bp, 3306 bp or 3442 bp, excluding the poly(A) region, agrees highly with the size (3.5 kb) of the mRNA obtained by the aforementioned northern blotting analysis. Since an in-frame stop codon exists in the 5'-region (nucleotide 34), the first ATG is admitted as an initiation codon.

[0071]

#### Industrial Applicability

As described above, the present invention provides genes expressed specifically in differentiated human-derived chondrocytes. These genes are important not only in analyzing the mechanism of differentiation or degeneration of a cartilage, but also in developing gene therapies for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Furthermore, CDEP according to the invention is expressed

in cartilage and other tissues, and thus its important actions in such other tissues are suggested.

[0072]

That is, CDEP of the invention, in view of its structural features, serves as a regulatory factor for a cytoskeleton binding to protein on a cell membrane, and also has a structure characteristic of an epistatic factor for regulating the functions of Rho. By controlling an actin-series cytoskeleton, i.e., activating Rho in response to signals from upstream to control signal transduction downstream, CDEP may maintain cell shape or regulate cell adhesion, cell aggregation, or cell motility. From the aspect of being a regulatory factor for cytoskeleton, CDEP may play important roles in the reconstruction of a cytoskeleton which occurs as a result of stimulation by cell growth factors, or cell transformation. For chondrocytes, changes in cell shape are closely related to differentiation, and it is known that differentiated chondrocytes takes a spherical form, while dedifferentiated chondrocytes is spindle-shaped. Hence, if the shape of a cell can be changed to a spherical form by accelerating or suppressing the functions of CDEP, it may be possible to induce or maintain the differentiation of chondrocytes. Gene introduction with the expectation of such an action may make it possible to control the differentiated state of chondrocytes with deviating functions (dedifferentiated chondrocytes) in arthropathies,

including osteoarthritis.

[0073]

Among other Rho GEF family members, some are known to work as oncogenes by arousing such abnormalities as the lack of an amino acid on the N-terminal side. They are reported to enhance the infiltrating ability of cancer. If it is found that active type mutation, such as deficiency in part of a CDEP gene, causes canceration of a cell, a novel therapeutic drug with a specific suppressive effect may be developed with CDEP as a target.

Also, it is conceivable to prepare a dominant negative mutant of CDEP, and introduce its gene into a cancer cell to inhibit the activity of the cancer cell, thereby achieving cancer treatment.

[0074]

Ezrin binds to CD44, etc. on a cell membrane at its N-terminus, and binds to actin on its C-terminal side, thereby taking part in cytoskeletal regulation. Rho is considered to regulate this binding. CDEP, which has an ezrin-like domain at the N-terminal, and DH and PH domains at the C-terminal, may bind to protein on the cell membrane at the N-terminal, and activate Rho on the C-terminal side. Thus, CDEP may be a regulatory factor for a cytoskeleton which binds to a cell membrane, and also be a factor for regulating signals to Rho by feedback of the state of the cytoskeleton. A major topic in future cancer research may

be how to control the functions of the entire Rho family,  
and the present invention may be considered as one possible  
target of such research.

5

10

15

20

25

[0075]

## [ Sequence Listing ]

SEQ ID No.: 1

Sequence length: 3442

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Type of sequence: cDNA

Antigen

Organism: human

Type of cell: chondrocyte

Sequence characteristics

Name indicating the characteristics: CDS

Location: 49..3183

## Sequence

CGCCGCAGCC GCCGGCGCTG TGGAGATATT CTCTAAGCCG CTTTCATC ATG GGA GAA ATA 60

Met Gly Glu Ile

1.

GAG CAG AGG CCG ACC CCA GGA TCA CGA CTG GGG GCC CCG GAA AAT 105

Glu Gln Arg Pro Thr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Ala Pro Glu Asn

5

10

15

TCG GGG ATC AGT ACC TTG GAA CGT GGA CAG AAG CCG CCC CCA ACA 150

Ser Gly Ile Ser Thr Leu Glu Arg Gly Gln Lys Pro Pro Pro Thr

20

25

30

CCT TCA GGA AAA CTC GTG TCC ATC AAA ATC CAG ATG CTG GAT GAC 195

Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Ile Lys Ile Gln Met Leu Asp Asp

35

40

45

ACC CAG GAG GCA TTT GAA GTT CCA CAA AGA GCT CCT GGG AAG GTG 240

Thr Gln Glu Ala Phe Glu Val Pro Gln Arg Ala Pro Gly Lys Val

50	55	60	
CTG CTG GAT GCA GTT TGC AAC CAC CTC AAC CTC GTG GAA GGT GAC	285		
Leu Leu Asp Ala Val Cys Asn His Leu Asn Leu Val Glu Gly Asp			
65	70	75	
TAT TTT GGC CTC GAG TTT CCT GAT CAC AAA AAG ATC ACG GTG TGG	330		
Tyr Phe Gly Leu Glu Phe Pro Asp His Lys Lys Ile Thr Val Trp			
80	85	90	
CTG GAT CTC CTA AAA CCC ATT GTG AAA CAG ATT AGA AGG CCA AAG	375		
Leu Asp Leu Leu Lys Pro Ile Val Lys Gln Ile Arg Arg Pro Lys			
95	100	105	
CAC GTT GTT GTT AAG TTT GTG GTG AAA TTC TTT CCG CCT GAC CAC	420		
His Val Val Val Lys Phe Val Val Lys Phe Phe Pro Pro Asp His			
110	115	120	
ACA CAA CTC CAA GAA GAA CTC ACA AGG TAC CTG TTC GCG CTG CAG	465		
Thr Gln Leu Gln Glu Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Gln			
125	130	135	
GTG AAG CAG GAC TTG GCT CAA GGC AGG TTG ACG TGT AAT GAC ACC	510		
Val Lys Gln Asp Leu Ala Gln Gly Arg Leu Thr Cys Asn Asp Thr			
140	145	150	
AGC GCA GCT CTC TTG ATT TCA CAC ATT GTG CAA TCT GAG ATT GGG	555		
Ser Ala Ala Leu Leu Ile Ser His Ile Val Gln Ser Glu Ile Gly			
155	160	165	
GAT TTT GAT GAA GCC TTG GAC AGA GAG CAC TTA GCA AAA AAT AAA	600		
Asp Phe Asp Glu Ala Leu Asp Arg Glu His Leu Ala Lys Asn Lys			
170	175	180	
TAC ATA CCT CAG CAA GAC GCA CTA GAG GAC AAA ATC GTG GAA TTT	645		
Tyr Ile Pro Gln Gln Asp Ala Leu Glu Asp Lys Ile Val Glu Phe			
185	190	195	
CAC CAT AAC CAC ATT GGA CAA ACA CCA GCA GAA TCA GAT TTC CAG	690		



His His Asn His Ile Gly Gln Thr Pro Ala Glu Ser Asp Phe Gln  
 200 205 210  
 CTC CTA GAG ATT GCC CGT CGG CTA GAG ATG TAT GGA ATC CGG TTG 735  
 Leu Leu Glu Ile Ala Arg Arg Leu Glu Met Tyr Gly Ile Arg Leu  
 215 220 225  
 CAC CCG GCC AAG GAC AGG GAA GGC ACG AAG ATC AAT CTG GCC GTT 780  
 His Pro Ala Lys Asp Arg Glu Gly Thr Lys Ile Asn Leu Ala Val  
 230 235 240  
 GCC AAC ACG GGA ATT CTA GTG TTT CAG GGT TTC ACT AAG ATC AAT 825  
 Ala Asn Thr Gly Ile Leu Val Phe Gln Gly Phe Thr Lys Ile Asn  
 245 250 255  
 GCC TTC AAC TGG GCC AAG GTG CGG AAG CTG AGC TTC AAG AGG AAG 870  
 Ala Phe Asn Trp Ala Lys Val Arg Lys Leu Ser Phe Lys Arg Lys  
 260 265 270  
 CGC TTT CTC ATC AAG CTC CGG CCA GAT GCC AAT AGT GCG TAC CAG 915  
 Arg Phe Leu Ile Lys Leu Arg Pro Asp Ala Asn Ser Ala Tyr Gln  
 275 280 285  
 GAT ACC TTG GAA TTC CTG ATG GCC AGT CGG GAT TTC TGC AAG TCC 960  
 Asp Thr Leu Glu Phe Leu Met Ala Ser Arg Asp Phe Cys Lys Ser  
 290 295 300  
 TTC TGG AAA ATC TGT GTT GAA CAT CAT GCC TTC TTT AGA CTT TTT 1005  
 Phe Trp Lys Ile Cys Val Glu His His Ala Phe Phe Arg Leu Phe  
 305 310 315  
 GAA GAG CCC AAA CCA AAG CCC AAG CCC GTC CTC TTT AGC CGG GGG 1050  
 Glu Glu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Val Leu Phe Ser Arg Gly  
 320 325 330  
 TCA TCA TTT CGG TTC AGT GGT CGG ACT CAG AAG CAG GTT CTC GAC 1095  
 Ser Ser Phe Arg Phe Ser Gly Arg Thr Gln Lys Gln Val Leu Asp  
 335 340 345

TAT GTT AAA GAA GGA GGA CAT AAG AAG GTG CAG TTT GAA AGG AAG 1140  
 Tyr Val Lys Glu Gly Gly His Lys Lys Val Gln Phe Glu Arg Lys  
 350 355 360  
 CAC AGC AAG ATT CAT TCT ATC CGG AGC CTT GCT TCA CAG CCT ACA 1185  
 His Ser Lys Ile His Ser Ile Arg Ser Leu Ala Ser Gln Pro Thr  
 365 370 375  
 GAA CTG AAT TCG GAA GTG CTG GAG CAG TCT CAG CAG AGC ACC AGC 1230  
 Glu Leu Asn Ser Glu Val Leu Glu Gln Ser Gln Gln Ser Thr Ser  
 380 385 390  
 CTT ACA TTT GGA GAA GGT GCC GAA TCT CCA GGG GGC CAG AGC TGC 1275  
 Leu Thr Phe Gly Glu Gly Ala Glu Ser Pro Gly Gly Gln Ser Cys  
 395 400 405  
 CGG CGA GGA AAG GAA CCG AAG GTT TCC GCC GGG GAG CCG GGG TCG 1320  
 Arg Arg Gly Lys Glu Pro Lys Val Ser Ala Gly Glu Pro Gly Ser  
 410 415 420  
 CAC CCG AGC CCT GCG CCG AGG AGA AGC CCC GCG GGT AAC AAG CAG 1365  
 His Pro Ser Pro Ala Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gly Asn Lys Gln  
 425 430 435  
 GCG GAC GGA GCC GCC TCG GCG CCC ACG GAG GAA GAG GAG GAG GTC 1410  
 Ala Asp Gly Ala Ala Ser Ala Pro Thr Glu Glu Glu Glu Glu Val  
 440 445 450  
 GTT AAG GAT AGG ACC CAG CAG AGT AAA CCT CAG CCC CCG CAG CCA 1455  
 Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Ser Lys Pro Gln Pro Pro Gln Pro  
 455 460 465  
 AGC ACA GGC TCC CTG ACT GGC AGT CCT CAC CTT TCC GAG CTG TCT 1500  
 Ser Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Pro His Leu Ser Glu Leu Ser  
 470 475 480  
 GTG AAC TCG CAG GGG GGA GTG GCC CCT GCC AAC GTG ACC TTG TCT 1545  
 Val Asn Ser Gln Gly Gly Val Ala Pro Ala Asn Val Thr Leu Ser

485	490	495	
CCC AAC CTG AGC CCC GAC ACC AAG CAG GCC TCT CCC TTG ATC AGC	1590		
Pro Asn Leu Ser Pro Asp Thr Lys Gln Ala Ser Pro Leu Ile Ser			
500	505	510	
CCG CTG CTG AAT GAC CAG GCC TGC CCC CGG ACG GAC GAT GAG GAT	1635		
Pro Leu Leu Asn Asp Gln Ala Cys Pro Arg Thr Asp Asp Glu Asp			
515	520	525	
GAG GGC CGG AGG AAG AGA TTC CCA ACT GAT AAA GCG TAC TTC ATA	1680		
Glu Gly Arg Arg Lys Arg Phe Pro Thr Asp Lys Ala Tyr Phe Ile			
530	535	540	
GCT AAG GAA GTG TCT ACC ACC GAG CGA ACA TAT CTG AAG GAT CTC	1725		
Ala Lys Glu Val Ser Thr Thr Glu Arg Thr Tyr Leu Lys Asp Leu			
545	550	555	
GAA GTT ATC ACT TCG TGG TTT CAG AGC ACA GTG AGC AAA GAG GAC	1770		
Glu Val Ile Thr Ser Trp Phe Gln Ser Thr Val Ser Lys Glu Asp			
560	565	570	
GCC ATG CCG GAA GCA CTG AAA AGT CTC ATA TTC CCG AAT TTT GAA	1815		
Ala Met Pro Glu Ala Leu Lys Ser Leu Ile Phe Pro Asn Phe Glu			
575	580	585	
CCT TTG CAC AAA TTT CAT ACT AAT TTT CTC AAG GAA ATT GAG CAA	1860		
Pro Leu His Lys Phe His Thr Asn Phe Leu Lys Glu Ile Glu Gln			
590	595	600	
CGA CTT GCC CTG TGG GAA GGC CGC TCA AAT GCC CAA ATC AGA GAT	1905		
Arg Leu Ala Leu Trp Glu Gly Arg Ser Asn Ala Gln Ile Arg Asp			
605	610	615	
TAC CAA AGA ATC GGC GAT GTC ATG CTG AAG AAC ATT CAG GGC ATG	1950		
Tyr Gln Arg Ile Gly Asp Val Met Leu Lys Asn Ile Gln Gly Met			
620	625	630	
AAG CAC CTG GCG GCT CAC CTG TGG AAG CAC AGC GAG GCC TTG GAG	1995		

Lys His Leu Ala Ala His Leu Trp Lys His Ser Glu Ala Leu Glu  
 635                      640                      645  
 GCC CTG GAG AAT GGA ATC AAG AGC TCC CGG CGG CTG GAG AAC TTC 2040  
 Ala Leu Glu Asn Gly Ile Lys Ser Ser Arg Arg Leu Glu Asn Phe  
 650                      655                      660  
 TGC AGA GAC TTT GAG CTG CAG AAG GTG TGT TAC CTA CCG CTC AAC 2085  
 Cys Arg Asp Phe Glu Leu Gln Lys Val Cys Tyr Leu Pro Leu Asn  
 665                      670                      675  
 ACC TTC CTC CTG CGG CCA CTG CAC CGG CTC ATG CAC TAC AAG CAG 2130  
 Thr Phe Leu Leu Arg Pro Leu His Arg Leu Met His Tyr Lys Gln  
 680                      685                      690  
 GTC CTG GAG CGG CTG TGC AAA CAC CAC CCG CCG AGC CAC GCC GAC 2175  
 Val Leu Glu Arg Leu Cys Lys His His Pro Pro Ser His Ala Asp  
 695                      700                      705  
 TTC AGG GAC TGC CGA GCC GCT TTG GCA GAG ATC ACG GAG ATG GTG 2220  
 Phe Arg Asp Cys Arg Ala Ala Leu Ala Glu Ile Thr Glu Met Val  
 710                      715                      720  
 GCA CAG CTC CAC GGT ACG ATG ATC AAG ATG GAG AAT TTC CAG AAG 2265  
 Ala Gln Leu His Gly Thr Met Ile Lys Met Glu Asn Phe Gln Lys  
 725                      730                      735  
 CTG CAC GAA CTC AAG AAA GAT TTG ATT GGC ATT GAC AAT CTT GTG 2310  
 Leu His Glu Leu Lys Lys Asp Leu Ile Gly Ile Asp Asn Leu Val  
 740                      745                      750  
 GTT CCG GGA AGG GAG TTC ATC CGT CTG GGC AGC CTC AGC AAG CTC 2355  
 Val Pro Gly Arg Glu Phe Ile Arg Leu Gly Ser Leu Ser Lys Leu  
 755                      760                      765  
 TCG GGG AAG GGG CTC CAG CAG CGC ATG TTC TTC CTG TTC AAC GAC 2400  
 Ser Gly Lys Gly Leu Gln Gln Arg Met Phe Phe Leu Phe Asn Asp  
 770                      775                      780

GTC CTG CTA TAC ACG AGC CGG GGG CTG ACG GCC TCC AAT CAG TTT 2445  
 Val Leu Leu Tyr Thr Ser Arg Gly Leu Thr Ala Ser Asn Gln Phe  
 785 790 795  
 AAA GTC CAC GGG CAG CTC CCG CTC TAT GGC ATG ACG ATT GAG GAG 2490  
 Lys Val His Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Met Thr Ile Glu Glu  
 800 805 810  
 AGC GAA GAC GAG TGG GGG GTG CCC CAC TGC CTG ACC CTC CGG GGC 2535  
 Ser Glu Asp Glu Trp Gly Val Pro His Cys Leu Thr Leu Arg Gly  
 815 820 825  
 CAG CGG CAG TCC ATC ATC GTG GCC GCC AGT TCT CGG TCC GAG ATG 2580  
 Gln Arg Gln Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Ser Arg Ser Glu Met  
 830 835 840  
 GAG AAG TGG GTT GAG GAC ATC CAG ATG GCC ATT GAC CTG GCG GAG 2625  
 Glu Lys Trp Val Glu Asp Ile Gln Met Ala Ile Asp Leu Ala Glu  
 845 850 855  
 AAG AGC AGC AGC CCC GCC CCT GAG TTC CTG GCC AGC AGC CCC CCT 2670  
 Lys Ser Ser Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Ala Ser Ser Pro Pro  
 860 865 870  
 GAC AAC AAG TCC CCT GAT GAA GCC ACC GCG GCT GAC CAG GAG TCA 2715  
 Asp Asn Lys Ser Pro Asp Glu Ala Thr Ala Ala Asp Gln Glu Ser  
 875 880 885  
 GAG GAT GAC CTG AGC GCC TCG CGC ACA TCG CTG GAG CGC CAG GCC 2760  
 Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ser Arg Thr Ser Leu Glu Arg Gln Ala  
 890 895 900  
 CCG CAC CGC GGC AAC ACA ATG GTG CAC GTG TGC TGG CAC CGC AAC 2805  
 Pro His Arg Gly Asn Thr Met Val His Val Cys Trp His Arg Asn  
 905 910 915  
 ACC AGC GTC TCC ATG GTG GAC TTC AGC ATC GCA GTG GAG AAT CAG 2850  
 Thr Ser Val Ser Met Val Asp Phe Ser Ile Ala Val Glu Asn Gln

920                      925                      930  
 TTG TCT GGA AAC CTG CTG AGG AAA TTC AAA AAC AGC AAC GGG TGG 2895  
 Leu Ser Gly Asn Leu Leu Arg Lys Phe Lys Asn Ser Asn Gly Trp  
 935                      940                      945  
 CAG AAG CTG TGG GTG GTG TTC ACA AAC TTC TGC CTG TTC TTC TAC 2940  
 Gln Lys Leu Trp Val Val Phe Thr Asn Phe Cys Leu Phe Phe Tyr  
 950                      955                      960  
 AAA TCA CAC CAG GAC AAT CAT CCC CTT GCC AGC CTG CCT CTG CTC 2985  
 Lys Ser His Gln Asp Asn His Pro Leu Ala Ser Leu Pro Leu Leu  
 965                      970                      975  
 GGC TAC TCG CTC ACC ATC CCC TCT GAG TCC GAG AAC ATC CAG AAA 3030  
 Gly Tyr Ser Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser Glu Asn Ile Gln Lys  
 980                      985                      990  
 GAC TAC GTG TTC AAG CTG CAC TTC AAG TCC CAC GTC TAC TAC TTC 3075  
 Asp Tyr Val Phe Lys Leu His Phe Lys Ser His Val Tyr Tyr Phe  
 995                      1000                      1005  
 AGG GCG GAA AGC GAG TAC ACG TTC GAA AGG TGG ATG GAA GTG ATC 3120  
 Arg Ala Glu Ser Glu Tyr Thr Phe Glu Arg Trp Met Glu Val Ile  
 1010                      1015                      1020  
 CGC AGT GCC ACC AGC TCT GCC TCG CGA CCC CAC GTG TTG AGC CAC 3165  
 Arg Ser Ala Thr Ser Ser Ala Ser Arg Pro His Val Leu Ser His  
 1025                      1030                      1035  
 AAA GAG TCT CTT GTG TAT TGA TGGCCGGACA CACTCGTTTC CGCAGTGGCT 3216  
 Lys Glu Ser Leu Val Tyr  
 1040  
 GCTTTCCTGG AAGACGTTTC CTTTCTTCTG TATTAATGAA GCCTGGTAAA ATTAACACCT 3276  
 GTCTGAAAAT CAAAAACATG GCTTCCCAGC AGCTCTCCTG TCTCCACAGC CGCGTTTTTT 3336  
 AACCCCGACC TCTCAGCGTT TGAATGAACA GCGCTCCCAC CTCCAGTCCT GGCATCCGCT 3396  
 GGGGGCGCTG TTCTTTAGCT AGTGCCAGTA TTA AACATT GTCATT 3442

SEQ ID NO.: 2

Length of sequence:

Type of sequence: amino acid

Topology: straight chain

Type of sequence: peptide

Sequence

```

Met Gly Glu Ile Glu Gln Arg Pro Thr Pro Gly Ser Arg Leu Gly
1           5           10           15
Ala Pro Glu Asn Ser Gly Ile Ser Thr Leu Glu Arg Gly Gln Lys
16          20          25          30
Pro Pro Pro Thr Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Ile Lys Ile Gln
31          35          40          45
Met Leu Asp Asp Thr Gln Glu Ala Phe Glu Val Pro Gln Arg Ala
46          50          55          60
Pro Gly Lys Val Leu Leu Asp Ala Val Cys Asn His Leu Asn Leu
61          65          70          75
Val Glu Gly Asp Tyr Phe Gly Leu Glu Phe Pro Asp His Lys Lys
76          80          85          90
Ile Thr Val Trp Leu Asp Leu Leu Lys Pro Ile Val Lys Gln Ile
91          95          100         105
Arg Arg Pro Lys His Val Val Val Lys Phe Val Val Lys Phe Phe
106         110         115         120
Pro Pro Asp His Thr Gln Leu Gln Glu Glu Leu Thr Arg Tyr Leu
121         125         130         135
Phe Ala Leu Gln Val Lys Gln Asp Leu Ala Gln Gly Arg Leu Thr
136         140         145         150
Cys Asn Asp Thr Ser Ala Ala Leu Leu Ile Ser His Ile Val Gln

```

151	155	160	165
Ser Glu Ile Gly Asp Phe Asp Glu Ala Leu Asp Arg Glu His Leu			
166	170	175	180
Ala Lys Asn Lys Tyr Ile Pro Gln Gln Asp Ala Leu Glu Asp Lys			
181	185	190	195
Ile Val Glu Phe His His Asn His Ile Gly Gln Thr Pro Ala Glu			
196	200	205	210
Ser Asp Phe Gln Leu Leu Glu Ile Ala Arg Arg Leu Glu Met Tyr			
211	215	220	225
Gly Ile Arg Leu His Pro Ala Lys Asp Arg Glu Gly Thr Lys Ile			
226	230	235	240
Asn Leu Ala Val Ala Asn Thr Gly Ile Leu Val Phe Gln Gly Phe			
241	245	250	255
Thr Lys Ile Asn Ala Phe Asn Trp Ala Lys Val Arg Lys Leu Ser			
256	260	265	270
Phe Lys Arg Lys Arg Phe Leu Ile Lys Leu Arg Pro Asp Ala Asn			
271	275	280	285
Ser Ala Tyr Gln Asp Thr Leu Glu Phe Leu Met Ala Ser Arg Asp			
286	290	295	300
Phe Cys Lys Ser Phe Trp Lys Ile Cys Val Glu His His Ala Phe			
301	305	310	315
Phe Arg Leu Phe Glu Glu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Val Leu			
316	320	325	330
Phe Ser Arg Gly Ser Ser Phe Arg Phe Ser Gly Arg Thr Gln Lys			
331	335	340	345
Gln Val Leu Asp Tyr Val Lys Glu Gly Gly His Lys Lys Val Gln			
346	350	355	360
Phe Glu Arg Lys His Ser Lys Ile His Ser Ile Arg Ser Leu Ala			
361	365	370	375



Ser Gln Pro Thr Glu Leu Asn Ser Glu Val Leu Glu Gln Ser Gln			
376	380	385	390
Gln Ser Thr Ser Leu Thr Phe Gly Glu Gly Ala Glu Ser Pro Gly			
391	395	400	405
Gly Gln Ser Cys Arg Arg Gly Lys Glu Pro Lys Val Ser Ala Gly			
406	410	415	420
Glu Pro Gly Ser His Pro Ser Pro Ala Pro Arg Arg Ser Pro Ala			
421	425	430	435
Gly Asn Lys Gln Ala Asp Gly Ala Ala Ser Ala Pro Thr Glu Glu			
436	440	445	450
Glu Glu Glu Val Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Ser Lys Pro Gln			
451	455	460	465
Pro Pro Gln Pro Ser Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Pro His Leu			
466	470	475	480
Ser Glu Leu Ser Val Asn Ser Gln Gly Gly Val Ala Pro Ala Asn			
481	485	490	495
Val Thr Leu Ser Pro Asn Leu Ser Pro Asp Thr Lys Gln Ala Ser			
496	500	505	510
Pro Leu Ile Ser Pro Leu Leu Asn Asp Gln Ala Cys Pro Arg Thr			
511	515	520	525
Asp Asp Glu Asp Glu Gly Arg Arg Lys Arg Phe Pro Thr Asp Lys			
526	530	535	540
Ala Tyr Phe Ile Ala Lys Glu Val Ser Thr Thr Glu Arg Thr Tyr			
541	545	550	555
Leu Lys Asp Leu Glu Val Ile Thr Ser Trp Phe Gln Ser Thr Val			
556	560	565	570
Ser Lys Glu Asp Ala Met Pro Glu Ala Leu Lys Ser Leu Ile Phe			
571	575	580	585
Pro Asn Phe Glu Pro Leu His Lys Phe His Thr Asn Phe Leu Lys			

586	590	595	600
Glu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Leu Trp Glu Gly Arg Ser Asn Ala			
601	605	610	615
Gln Ile Arg Asp Tyr Gln Arg Ile Gly Asp Val Met Leu Lys Asn			
616	620	625	630
Ile Gln Gly Met Lys His Leu Ala Ala His Leu Trp Lys His Ser			
631	635	640	645
Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Asn Gly Ile Lys Ser Ser Arg Arg			
646	650	655	660
Leu Glu Asn Phe Cys Arg Asp Phe Glu Leu Gln Lys Val Cys Tyr			
661	665	670	675
Leu Pro Leu Asn Thr Phe Leu Leu Arg Pro Leu His Arg Leu Met			
676	680	685	690
His Tyr Lys Gln Val Leu Glu Arg Leu Cys Lys His His Pro Pro			
691	695	700	705
Ser His Ala Asp Phe Arg Asp Cys Arg Ala Ala Leu Ala Glu Ile			
706	710	715	720
Thr Glu Met Val Ala Gln Leu His Gly Thr Met Ile Lys Met Glu			
721	725	730	735
Asn Phe Gln Lys Leu His Glu Leu Lys Lys Asp Leu Ile Gly Ile			
736	740	745	750
Asp Asn Leu Val Val Pro Gly Arg Glu Phe Ile Arg Leu Gly Ser			
751	755	760	765
Leu Ser Lys Leu Ser Gly Lys Gly Leu Gln Gln Arg Met Phe Phe			
766	770	775	780
Leu Phe Asn Asp Val Leu Leu Tyr Thr Ser Arg Gly Leu Thr Ala			
781	785	790	795
Ser Asn Gln Phe Lys Val His Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Met			
796	800	805	810

Thr Ile Glu Glu Ser Glu Asp Glu Trp Gly Val Pro His Cys Leu  
 811                      815                      820                      825  
 Thr Leu Arg Gly Gln Arg Gln Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Ser  
 826                      830                      835                      840  
 Arg Ser Glu Met Glu Lys Trp Val Glu Asp Ile Gln Met Ala Ile  
 841                      845                      850                      855  
 Asp Leu Ala Glu Lys Ser Ser Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Ala  
 856                      860                      865                      870  
 Ser Ser Pro Pro Asp Asn Lys Ser Pro Asp Glu Ala Thr Ala Ala  
 871                      875                      880                      885  
 Asp Gln Glu Ser Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ser Arg Thr Ser Leu  
 886                      890                      895                      900  
 Glu Arg Gln Ala Pro His Arg Gly Asn Thr Met Val His Val Cys  
 901                      905                      910                      915  
 Trp His Arg Asn Thr Ser Val Ser Met Val Asp Phe Ser Ile Ala  
 916                      920                      925                      930  
 Val Glu Asn Gln Leu Ser Gly Asn Leu Leu Arg Lys Phe Lys Asn  
 931                      935                      940                      945  
 Ser Asn Gly Trp Gln Lys Leu Trp Val Val Phe Thr Asn Phe Cys  
 946                      950                      955                      960  
 Leu Phe Phe Tyr Lys Ser His Gln Asp Asn His Pro Leu Ala Ser  
 961                      965                      970                      975  
 Leu Pro Leu Leu Gly Tyr Ser Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser Glu  
 976                      980                      985                      990  
 Asn Ile Gln Lys Asp Tyr Val Phe Lys Leu His Phe Lys Ser His  
 991                      995                      1000                      1005  
 Val Tyr Tyr Phe Arg Ala Glu Ser Glu Tyr Thr Phe Glu Arg Trp  
 1006                      1010                      1015                      1020  
 Met Glu Val Ile Arg Ser Ala Thr Ser Ser Ala Ser Arg Pro His

1021

1025

1030

1035

Val Leu Ser His Lys Glu Ser Leu Val Tyr

1036

1040

SEQ ID NO.: 3

Length of sequence: 25

Type of sequence: nucleic acid

Number of strands: double stranded

5 Topology: straight chain

Sequence

CATACCGGTA AGTGGGGCAA GACTG 25

SEQ ID NO.: 4

10 Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

15 TGCCCAGTTC AGGTCTCTTA 20

SEQ ID NO.: 5

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

20 Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

TGCTACTTCA TCGACCCCAT 20

25 SEQ ID NO.: 6

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

5 AAAGACCTCA CCCTCCATCT 20

SEQ ID NO.: 7

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

10 Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

GTCGATTACG TGGAGAGCTA 20

15 SEQ ID NO.: 8

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

20 Sequence

ATGAACTTCT TCACCAGCTC 20

SEQ ID NO.: 9

Length of sequence: 20

25 Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

GTCAAGGCTG AGAACGGGAA 20

5 SEQ ID NO.: 10

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

10 Sequence

TCCACCACCC TGTTGCTGTA 20

SEQ ID NO.: 11

Length of sequence: 20

15 Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

ATCAGACCCA GCTCCCAAAG 20

20

SEQ ID NO.: 12

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

25 Topology: straight chain

Sequence

CACAGACCCA GCTCCCAAAC 20

SEQ ID NO.: 13

Length of sequence: 20

5 Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

CCTTCAGGAA AACTCGTGTC 20

10

SEQ ID NO.: 14

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

15 Topology: straight chain

Sequence

TTGGAGTTGT GTGTGGTCAG 20

SEQ ID NO.: 15

20 Length of sequence: 25

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

25 GCCAAAATAG TCACCTTCCA CGAGG 25



SEQ ID NO.: 16

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

5 Topology: straight chain

Sequence

CCTTCAGGAA AACTCGTGTC 20

SEQ ID NO.: 16

10 Length of sequence: 29

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

15 AAACGRAAGA AYGTRTGRTG YTCWACACA 29

SEQ ID NO.: 17

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

20 Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

TTCCAGCTCC TAGAGATTGC 20

25 SEQ ID NO.: 18

Length of sequence: 20

Sequence type: nucleic acid

Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

5 TCGTCTTCGC TCTCCTCAAT 20

SEQ ID NO.: 19

Length of sequence: 23

Sequence type: nucleic acid

10 Number of strands: double stranded

Topology: straight chain

Sequence

CGGGTAACAA GCAGGCGGAC GGA 23

[Brief Description of the Drawings]

15 [ Fig. 1 ]

Fig. 1 is a view showing a nucleic acid nucleotide sequence of CDEP cDNA, and an amino acid sequence deduced therefrom, in which ezrin-like domain is indicated by an open frame, Dbl homology (DH) domain is underlined, pleckstrin homology (PH) domain is double-underlined, an asterisk downstream from a protein coding region represents a stop codon, a poly(A) addition signal is indicated by a dashed line, and a poly(A) addition site is indicated by a triangle;

25 [ Fig. 2 ]

Fig. 2 (a) and (b) are electrophoretic photographs

indicating a northern blot analysis of CDEP mRNA. Human fetal chondrocytes cultured in as well as not in the presence and Bt2cAMP, various human fetus tissues (a), and adult tissues (b) were transferred to a nylon membrane after electrophoresis with a 1% agarose gel containing formaldehyde. The membrane was hybridized with a cDEP probe (CDEP) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Ch- represents Bt2cAMP untreated fibroblast chondrocytes, Ch+ represents Bt2cAMP-dependent differentiated chondrocytes, Br represents the brain, He represents the heart, Li represents the liver, Sp represents the spleen, In represents the intestines, Lu represents the lungs, Te represents the testicles, Pl represents the placenta, and Mu represents muscle. The size of the CDEP mRNA is represented with kb.

[ Fig. 3 ]

Fig. 3 is a view showing the arrangement of an ezrin-like domain and a Db1 homology (DH) domain, and comparisons among ezrin-like domain of human CDEP, ezrin, and band 4.1, in which the residues conserved with respect to CDEP are indicated in bold type;

[ Fig. 4 ]

Fig. 4 is a view showing comparisons among DH domain of human CDEP, human Db1, rat Ost, mouse Est2, and human FGD1, in which the residues conserved with respect to CDEP are indicated in bold type;

[ Fig. 5 ]

Fig. 5 is a schematic view showing the relation between CDEP and other proteins; An ezrin-like domain, protein tyrosine phosphatase (PTP) domain, Dbl homology (DH) domain, and pleckstrin (PH) domain are indicated.

[ Fig. 6 ]

Fig. 6 is an electrophoretogram showing the results of RT-PCR (reverse transcription PCR) of mRNA of type II collagen, aggrecan, cartilage matrix protein (CMP), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (upper row), DEC1 and CDEP (lower row), expressed in response to Bt<sub>2</sub>cAMP in fetal human chondrocytes, in which cAMP+ represents the presence of Bt<sub>2</sub>cAMP, while cAMP- represents the absence of Bt<sub>2</sub>cAMP. The entire RNA prepared from chondrocytes in the presence of Bt<sub>2</sub>cAMP (cAMP+) and the entire RNA prepared from chondrocytes not in the presence of Bt<sub>2</sub>cAMP (cAMP-) were used.

[Document Name] ABSTRACT

[Abstract]

[Problem]

5           The present invention provides a human  
chondrocyte-derived gene.

[Means of Solution]

10           A protein encoded by the human chondrocyte-derived  
gene according to the invention has a structure  
characteristic of a regulatory factor for a cytoskeleton  
binding to protein on a cell membrane, and also an epistatic  
factor for regulating the functions of Rho. In detail, the  
protein has all of an ezrin-like domain, a DH domain, and  
a PH domain.

[Selected Drawing] Fig. 5

(1)

Name of Documents

【書類名】~~図面~~ Drawings

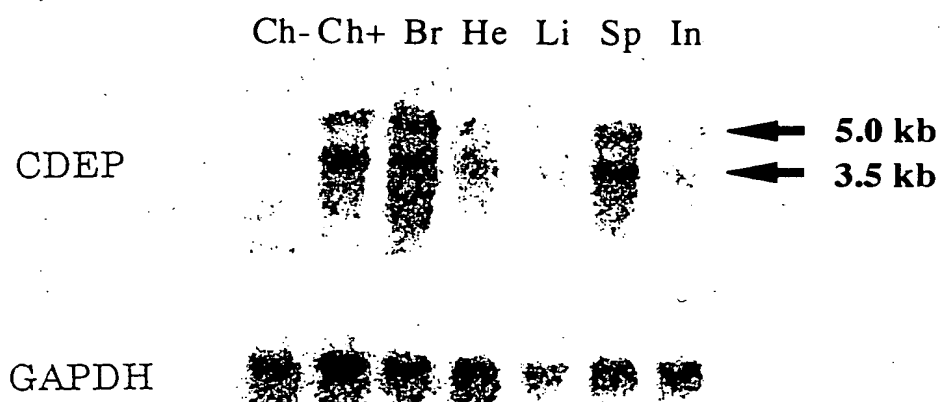
【**图一**】

Fig. 1

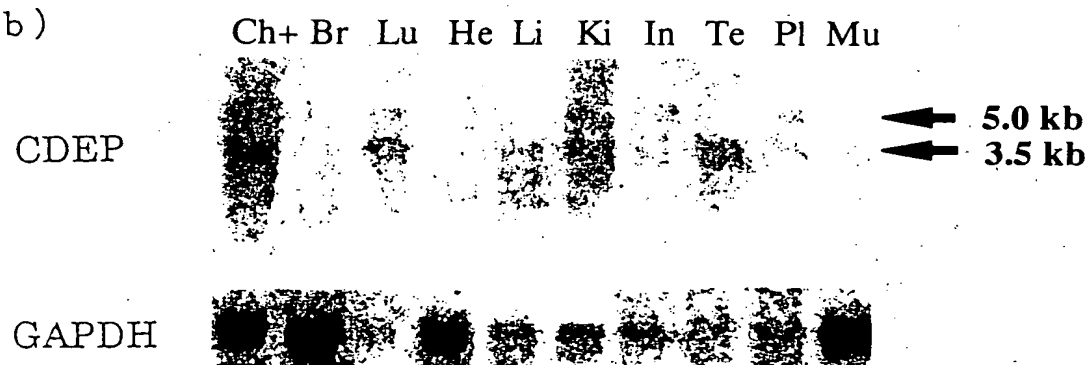
CCGCCGAGCCGCCGCCGCTGTGGAGATATTCTTAAGCCGCTTTCATATGGAGAAATAGACGACAGGCCGACCCAGGATCAGCACTGGGGGCCCGGAAAATTCGGGATCAGTACC	12
TTGGAACGTGGACAGAACGCCGCCCAACACCTTCAGGAAAATCGTGTCTACATAAAATCCAGATCGTGGAATGACACACGAGGAGGATTTGAAGTCCACAAAGAGCTCTGGGAAGGTG	24
CTCGTGGATGCGATTTGCAACCACCTCAACCTCGTGGGAAGTGACTATTTGGCCCTCGAGTTCTCGATCAAAAAAGATCAGCGTGTGGCTGGATCTCTAAACCCATTTGGAACAG	36
ATTGAAGGCCCAAGACGCTGTTGTTAAAGTTGTGGTGAATCTTTCCGCTGACCAACACACATCCAAAGAAGATCCAAAGTACTGTTCCGGCTCAGGTGACGAGGACGCTG	48
GCTCAAGGCAGGTTGAGCTGTAAATGACACACGCCAGCTCTCTTGATTTCACACATTTGCGCAATCTGAGATTGGGGATTGATGAAGCCTTGGACAGAGAGCACTTAGCAAAAAATAA	60
TACATACCTCAGCAAGACGCTAGAGGACAAATCGTGAATTTACCATAACCATTTGGACAACACCCAGCAGAAATCAGATTTCCAGCTCCTAGAGATTCGCCCTCGGTAGAGATG	72
TATGGAATCCGGTGCACCCGCAAGGACAGGGAAGCAGCAAGATCAATCGCCCTGCCAACAGGGAAATCTAGTGTCTCAGGTTTCACTAAGATCAATGCTTCAACTGGGCC	84
AAGGTGCGGAAGCTGAGCTTCAAGAGGAAGCGCTTCTCATCAAGCTCCGGCCAGATGCCAATAGTCGCTACCCAGGATACCTTGAATTCCTGATGGCCAGTGGGATTTCTGCAAGTCC	96
TTCTGGAATAATCTGTGTTGAACATCATGCTCTTTAGACTTTTGAAGAGCTCCAAACCAAGCCAGCCGCTCTCTTAGCCGGGGTGATCATTTCCGTTACGTGCTCGACTCAG	108
AAGCAGGTTCTGCACTATGTTAAAGAAGGAGACATAAGAAGGTGCAGTTTGAAGGAAGCAGCAAGATTCATTCCTCCGGAGCTTCTGCTACAGCCTACAGAACTGAATTTGAA	120
GTGCTGGAGCAGTCTCAGCAGAGCACCAGCCTTACATTTGGAGAAGGTGGCAATCTCCAGGGGGCCAGAGCTCCGGGGCAGGAAGGAACCGAAGGTTCCGGCCGGGAGCCGGGGTCG	132
CACCCAGAGCCTCGCCCGAGGAGTAAGGCCCCGGGTAAACAGCAGCGGAGAGCCGCTCGGCCGCCAGGGAAGAGGAGGCTGCTTGAAGATAGGACCCAGCAGATAAATCT	144
CAGCCCCCGCAGCCCAAGCAGGCTCCCTGACTGCGTCTCCAGCTCTCCGAGTCTGTGGAATCTCGCAGGGGGAGTGGCCCTGCCAAGCTGACCTTGTCTCCCAACCTGAGCCCC	156
GACACCAAGCAGGCTCTCCCTTGATCAGCCGCTGCTGAATGACAGGCTGCCCCCGGAGCAGCATGAGGATGAGGGCCGGAGGAAGAGATTTCCCAATGTATAAGCGTATCTCATA	168
GCTAAGGAAGTGTCTACCACCGAGCGAACATATCTGAAGGATCTCGAAGTTATCACITCTGTTGTTTTCAGAGCAGTGAAGCAAGGAGGCCATCCGGGAAGCACTGAAAGTCTCATA	180
TTCCCGAATTTTGAACCTTTTGCACAAATTTCACTAATTTTCTCAAGGAAATGACAGACGATTCGCCCTGTGGGAAGGCCGCTCAAAATGCCAAATCAGAGATACCAAGAATCGGC	192
GATGTCTGAGTGAAGAACATTCAGGAGTATGAAGCAGCTGGCGGCTCAGCTTGTGAAGCAGCAGGCGCTTGGAGCCCTGGAGAATCAAGAGTCCCGGGCGCTGGAGAACCT	204
TGCAGAGACTTTGAGCTGCAGAAGGTGTGTACTACCGCTCAACACCTTCTCTCTCGGCCACTGACCCGCTCATGCACTACAAGCAGGTCCTGGAGCGGCTGTGCAAAACCCACCGC	216
CCGAGCACCGCCGACTTCAGGAGCTCCGAGCGCTTTGGCAGAGATCAGCGAGATGTGGCAGCAGCTTCACGGTACGATGATCAAGTGGAGAATTTCCAGAAGCTGCACAACTCAAG	228
AAAGATTTGATTGGCATTGCAATCTGTGTTCCGGGAAGGGAGTTCATCGCTGGGCAGCCTCAGCAAGCTCTCGGGGAAGGGGCTCCAGCAGCGCATGTTCTTCTCTGCAACGAC	240
GTCTGCTATACAGCAGCGCGGGGCTGACGGCTCCAATCAGTTTAAAGTCAACGGGACGCTCCCGCTCTATGGCATGACGATTGAGGAGAGCGAAGCAGTGGGGGTCGCCACTGC	252
CTGACCTCTCGGGGCCAGCGGCACTCATCATCTGTCGGCCGAGTCTCGGTTCGAGATGGAGAATGGGTTGAGTACATCCAGATGCCCATGCACTGCGGCGGAAGCAGCAGCCCC	264
GCCCTCTGAGTCTCTGAGCCAGCAGCCCTTGAACAAGTCCCTGATGAAGCCACCCGCGCTGACCCAGGATCAGAGGATGACCTGAGCCCTCGGCACATCTGCTGAGCGCCAGCGC	276
CGCCACCGGGGCAACAAGTGGTGCAGCTGTGCTGGCCGCAACACAGGCGCTCCATGGTGAGCTTCAGCATTCGAGTGGAGAATCAGTTGTCGGAACCTGCTGAGGAAGATTCAAA	288
AACGACCAAGCGGTGCGAGAAGCTGTGGTGGTGTTCACAAATCTCGCTGTCTCTACAAATCACCAGGACATCATCCCCCTGCCAGCTGCCCTGTGCTCGGCTACTGCTCACC	300
ATCCCTCTGAGTCCGAGAACCTCAGAAAGACTAGTGTTCAGCTGCTCACTTCAAGTCCAGCTTACTACTTCAGGCGGGAAGCAGTACAGTTTGAAGAGTGGATGGAGTATC	312
CGCAGTCCACAGCAGCTGCTGCTCGGACCCACGCTGTGAGCCACAAGAGTCTTGTGATTTAGTGGCCGACACACTCGTTTCCGAGTGGCTGCTTCTCGGAAGACGTTCTCCTT	324
CTTCTGTATTAAAGACGCTGGTAAATTAACACCTGTCTGAAATCAAAAAATGGCTTCCAGAGCTCTCTGTCTCAGCAGCGCGTTTAAACCCGACCTCTCAGCGTTTGA	336
TGAACAGCGCTCCACCTCCAGTCTCGGATCGCTGGGGGCGCTGTCTTTAGCTAGTGGCAGTATTAACAATTTGCAAT	348

【~~図2~~】  
*Fig. 2*

(a)



(b)



【図3】  
Fig. 3

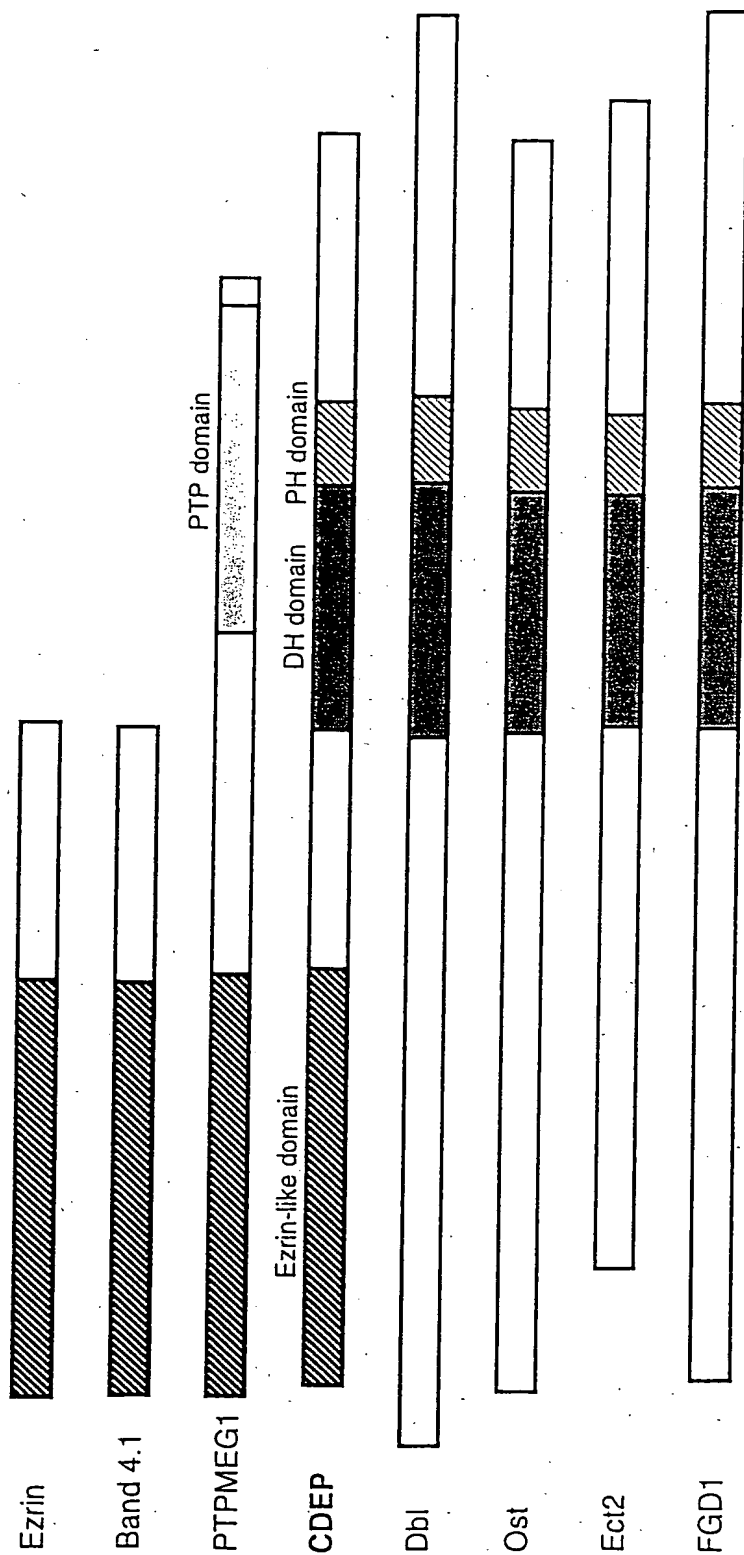
CDEP	1	MGEIEQRTPGSRGAPENSGISTLERGQKPPPTPSGKLVSIKIQMLDDTQEAPEVPQRPAP.GKVL
Ezrin	1	.....MPKPINVRVTT...MDAELEFA..IQPNTTGKQL
Band 4.1	1	.....MHCKVSLDDTVYEC.VVEKHAKGQDL
CDEP	66	LDAVCNHLNLVEGDYFGLFPPDHKKITVWLDLLKPIVKQIRRPKHVVVK.FVVKFFPPDHTQLQEE
Ezrin	30	FDQVVKTIGLREVWYFGLHYVDNKGFTWLKDKKVSQAQEVKRNPLQFKFRAKFYPEDVAEELIQ
Band 4.1	27	LKRVCEHLNLEEDYFGLAIWDNATSKTWLDSAKEIKKQ.VR.GVPWNETFNVKFYFPDPAQLTED
CDEP	131	LTRY.LEFALQVKQDLAQGR LTCNTSAALLISHIVQSEIGDFD.EALDREHLAKNKYIPQQ.....
Ezrin	95	DITQKLFLLQVKEGILSDEIYCPPEPETA VLLGSYAVQAKFGDYNKEVHKSGYLSSERLIPQRMVDQH
Band 4.1	91	ITRYVLC.LQLRQDIVAGRLPCSFATLAILGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQ.....
CDEP	190	....DALEDKIVEFHHNHIGQTPAESDFQLLEIARRLEMYGIRLHPAKDREGTKINLAVANTGILV
Ezrin	161	KLTRDQWEDRIQVWHAEHGRMLKDNAMLEYLKIAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVDA LGLNI
Band 4.1	151	...TKELEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENAKKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLIV
CDEP	252	FQGF TKINA...FNWAKVKLSFKRRKRLIKLRPDANSAYQDTLEFLMASRDFCKSFWKICVVEHHA
Ezrin	227	YEXDDKLT PKIGFPWSEIRNISFNDDKKFVIKPIDKKAPDF....VFYAPRLRINKRILQLCMGNHE
Band 4.1	214	YKDKLRINR...FPWPKVLKISYKRSSFYKIRPGEQEQYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHT
CDEP	315	FFRLFEPPKPKPVLFSGSSFRSGRTQKQVLDVYKEGGHKKVQ.FERKHSKIHRS.L
Ezrin	289	LYMRRRKPD TIEVQQMKQAQAREKH....QKLERQOLETEKKRRRETVEREKEQMMREKEEL
Band 4.1	277	FFRLTS.TDTIPKSKFLALGSKFRYSGRTQAQTRQASALIDRPAPH.FERTASKRAS.RS.L



【~~図~~4】  
Fig. 4

CDEP	544	I A K E V S T T E R T Y L K D L E V I T S W F Q S T V S K E . . . . . D A M P E A L . . . . . K S L I F P N F E P L H K F H T N . F L K .
Dbl	499	V L N E L I Q T E R V Y V R E L Y T V L L G Y R A E M D N P E M F D L M P P L L R N K K D I L F G N M A E I Y E F H N D I F L S .
Ost	446	V M N E L L D T E R A Y V E E L L C V L E G Y A A E M D N P L M A H L I S T G L Q N K K N I L F G N M E E I Y H F H N R I F L R .
Ect2	281	V A K E L Y Q T E S N Y V N I L A T I I Q L F Q V P L E E G Q R G G P I L A P E E I K T . I F G S I P D I F D V H M K I K D . .
FGD1	376	I A N E L L Q T E K A Y V S R L H L L D Q V F C A R L L E A . . R N R S S F P A D V V H G I F S N I C S I Y C F H Q Q . F L L P
CDEP	601	E I E Q R L A L W E G R S N A Q I R D Y Q R I G D V M L K N I Q Q M K H L A A H L W K H S E A L E A L E N C I K S R R L E N F C
Dbl	563	S L E N C A H A . . . . . P E R V G P C F L E R . K D D F Q M Y A K Y C Q N K P R S E T I W R K Y S E . . . . . C
Ost	510	E L E S C I D C . . . . . P E L V G R C F L E R . M E E F Q I Y E K Y C Q N K P R S E S L W R Q C S D . . . . . C
Ect2	343	D L E D L I A N W D E . . . . . S R S I G D I F L K Y A K D L V K T Y P P F V N F F E M S K E M I K C E K . . Q K P R F H
FGD1	439	E L E K R M E E W D R . . . . . Y P R I G D I L Q L A P F L K M Y G E Y V K N F D R A V E L V N T W T E R S T Q F K V I I
CDEP	666	R D F . E L Q K V C Y . . . . . L P L N T F L L R P L H R L M H Y K Q V L . E R L C K H P P S H A D F R D C R A A L A E I T E M V A
Dbl	609	A F F Q E C Q R K L K H R . L R L D S Y L L K P V O R I T K Y Q L L L K E . L L K Y S K D C E G S A . L L K K A L D A M L D L . .
Ost	556	P F F Q E C Q K L D H K . . L S L D S Y L L K P V O R I T K Y Q L L L K E . M L K Y S K H C E G A E . D L Q E A L S S I L G I . .
Ect2	400	A F L K I N Q A K P E C G R Q S I V E L L I R P V Q R L P S V A L L L N D . L K K H T A D E N P D K S T L E K A I G S L K E V . .
FGD1	496	H . . . . . E V Q K E E A C G N L T L Q H H M L E P V Q R I P R Y E L L L K D Y L L K L P H G S . P D S K D A Q K S L E L I A T A . .
CDEP	726	Q L H G T M I R M E N F
Dbl	669	. . . . . L K S V N D
Ost	616	. . . . . L K A V N D
Ect2	460	. . . . . M T H I N D
FGD1	555	. . . . . A E H S N A

【図5】  
Fig. 5



【図6】

Fig. 6

